

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

EXALTATION DU POUVOIR PATHOGENE DU VIRUS DE L'ENCÉPHALOMYÉLITE ENZOOTIQUE DES PORCS INOCULÉ PAR VOIE HYPODERMIQUE

par H. JACOTOT, B. VIRAT, A. VALLÉE, J.-C. LEVADITI
et J.-C. GUILLON (*)

[avec la collaboration technique de E. LAVAL].

*(Institut Pasteur, Services de Microbiologie Animale
et d'Histopathologie)*

L'exaltation de l'immunogénèse, notamment par l'emploi de substances adjuvantes, est une notion bien établie aujourd'hui, dont les applications sont nombreuses en bactériologie et en sérologie. On possède également, et depuis plusieurs dizaines d'années, des exemples caractérisés de stimulation du pouvoir allergisant. Mais on connaît peu de procédés permettant d'augmenter la virulence des microbes pour le sujet auquel on les inocule : le pouvoir pathogène d'un certain nombre de bactéries est sensiblement accru, par voie péritonéale, lorsqu'on les injecte en mélange avec de la mucine qui, pense-t-on, leur forme un revêtement protecteur ; l'hyaluronidase jointe à certains virus, tels le virus vaccinal et le virus rabique, accélère leur diffusion dans

(*) Manuscrit reçu le 20 octobre 1960.

l'organisme et aggrave l'évolution de l'infection ; chez la souris, l'injection intrapéritonéale de sels biliaires ou de certains détergents augmente la virulence de nombreux germes ; enfin le mélange adjuvant gélose-alun est susceptible d'exalter *in situ* la virulence de souches vaccinales de la bactériémie charbonneuse et par là même de susciter la maladie chez certains animaux particulièrement sensibles, comme le cheval, le mouton et la chèvre.

Nous avons constaté que le virus de l'encéphalomyélite contagieuse des porcs incorporé à un excipient gras était apte à déclencher, après inoculation sous-cutanée, des troubles de même nature et de même gravité que ceux qui font suite à l'inoculation intracérébrale du virus ; or, injecté par voie hypodermique en suspension aqueuse, ce virus ne détermine qu'exceptionnellement la maladie. Toutes nos expériences ont été faites sur des porcs de race Large White.

L'observation suivante que nous rapportons avec quelque détail est parfaitement démonstrative :

Des fragments d'encéphale de trois porcs atteints d'encéphalomyélite sont broyés mécaniquement ; on incorpore 20 g de la pulpe obtenue à 20 g de lanoline stérile, puis on dilue dans 135 ml d'huile de vaseline, ajoute 1,5 ml de formol au 1/10 et agite mécaniquement. La suspension grasse est alors déposée dans une étuve à 37° ; vingt-quatre heures après on la transporte dans un réfrigérateur à 6°. On inoculera successivement deux groupes de jeunes porcs âgés de 7 mois et pesant de 60 à 70 kg.

1° Après vingt-quatre heures d'étuvage et trois jours en glacière, le mélange gras est injecté aux porcs 269, 279 et 271, qui en reçoivent chacun sous la peau de la face interne des cuisses 10 ml en deux injections de 5 ml. Le matin du neuvième jour, des troubles apparaissent chez les deux premiers ; 269 est en décubitus latéral et 279 est paraplégique ; le soir, leurs températures atteignent 41°3 et 41°4 ; on les sacrifie *in extremis* le lendemain ; quant à 271, le matin du dixième jour il est chancelant et cesse de manger ; le lendemain, la paralysie s'installe et la température est de 41°5 ; l'animal meurt douze jours et demi après l'inoculation.

2° Après vingt-quatre heures d'étuvage et onze jours en glacière, le même mélange gras est injecté aux porcs 280 et 281 qui en reçoivent chacun 20 ml sous la peau des cuisses, en deux injections de 10 ml. Six jours après, on enregistre les premiers troubles locomoteurs accompagnés d'une légère hyperthermie ; après quarante-huit heures, l'état des animaux paraît s'améliorer, mais il y a reprise de l'évolution et ils meurent paralysés, le premier, quinze jours, le deuxième, douze jours après l'inoculation.

Les examens histologiques de l'encéphale et de la moelle lombaire ont révélé des lésions intenses et bien caractérisées chez tous ces animaux, à l'exception du 280 dont l'infection a évolué plus lentement ; d'une manière générale, les images cytologiques traduisent un état

fluxionnaire plutôt qu'une action destructrice ; voici deux extraits des observations faites sur les coupes :

Porc 269 : Méningo-encéphalomyélite aiguë intéressant surtout les cellules avec d'énormes manchons périvasculaires histio-lymphocytaires disséminés ; en outre, dans la moelle, involution des neurones moteurs.

Porc 271 : Méningo-encéphalomyélite aiguë et chronique de même intensité ; les plages d'œdème et les îlots de rassemblement avec involution, de toutes les cellules de la corne d'Ammon, les destructions vasculaires, la fibrose et la disparition progressive des neurones témoignent d'un certain état de chronicité.

Les constatations faites au cours de cette expérience se trouvent confirmées par l'observation suivante, et même étendues en ce sens qu'en appliquant la même technique on a vu la maladie de Teschen évoluer chez des porcs adultes, sujets notoirement résistants à l'infection et souvent réfractaires même à l'inoculation intracérébrale du virus.

Des fragments d'encéphale de deux porcs atteints d'encéphalomyélite sont broyés ; une partie de la pulpe obtenue est incorporée à l'excipient lanoline-huile de vaseline selon la technique exposée précédemment, avec addition au mélange de la même proportion de formol. D'autre part, on prépare une suspension aqueuse au 1/8 de la même pulpe, non additionnée de formol.

1° Immédiatement après ces manipulations on inocule deux porcelets de 3 mois : l'un, n° 307, reçoit par voie intracérébrale, en deux points, 0,50 ml de virus en suspension aqueuse ; il présente les premiers symptômes de maladie de Teschen six jours après ; on le sacrifie *in extremis* quatre jours plus tard ; l'autre, n° 308, reçoit sous la peau de la face interne des cuisses 10 ml au total de virus en excipient gras formolé ; il présente les premiers troubles huit jours après ; on le sacrifie *in extremis* le lendemain.

2° La suspension grasse a été déposée dans l'étuve à 37°. Après dix-huit heures d'étuvage on l'injecte à 3 animaux, toujours sous la peau des cuisses ; le porcelet 309, âgé de 3 mois, reçoit 10 ml ; il présente les premières manifestations le septième jour et meurt le dixième jour. Le jeune porc 291, de 5 mois, reçoit 15 ml ; il présente les premiers troubles le sixième jour et meurt le neuvième jour. Enfin, un porc, n° 283, de 1 an, reçoit 20 ml ; il manifeste les premiers troubles thermiques et locomoteurs le dixième jour et meurt le dix-septième jour.

3° Après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve, le mélange gras a été mis au réfrigérateur à 6°. Trois jours après on le reprend pour inoculer une série de trois porcs composée comme la précédente et selon la même posologie. Le porcelet 310, le jeune porc 293 et le porc adulte 284 présentent les premiers troubles six jours, quatre jours et huit jours après respectivement ; ils meurent dix jours, dix-sept jours et vingt et un jours après l'inoculation.

On a effectué les examens histopathologiques de l'encéphale et de la moelle lombaire de 5 de ces animaux ; les prélèvements des por-

celets 307 (témoin : inoculation intracérébrale de virus), 308, 309 et 291 (injection hypodermique du mélange gras extemporanément et après étuvage de dix-huit heures) offraient les mêmes images d'encéphalomyélite, et également accusées ; l'observation concernant le porc adulte mort vingt et un jours après l'inoculation se résumait ainsi : congestion intense de la substance grise de la moelle et de tout l'encéphale avec, parfois, formation de micro-hémorragies ; la réaction gliale et les processus dégénératifs sont très discrets.

De toutes ces constatations expérimentales il découle que même après un temps de contact assez long : vingt-quatre heures à la température de 37°, et plusieurs jours à celle de 6° (trois jours et onze jours), la propriété que possède le virus, en excipient gras, de déterminer la maladie n'est pas affectée par la présence de formol à la concentration indiquée. Nous nous sommes posé la question de savoir si cette présence conditionnait l'exaltation du pouvoir pathogène ; la réponse est apportée par l'expérience suivante.

Des fragments d'encéphale de deux porcs atteints d'encéphalomyélite sont soumis au broyage. Le titrage de la pulpe nerveuse est effectué immédiatement ; trois porcelets, n^{os} 349, 361 et 359, reçoivent par inoculation intracérébrale 0,5 ml des dilutions 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ respectivement. Les deux premiers commencent à présenter des troubles huit jours après et meurent respectivement douze et quatorze jours après l'inoculation ; le troisième présente des signes discrets et fugaces, sans plus.

D'autre part, une partie de la suspension aqueuse au 1/8 qui a servi à la préparation des dilutions pour titrage est additionnée de formol dans la proportion de 4 p. 1 000 et on l'injecte sans tarder à trois porcelets, chacun en recevant 10 ml en deux points sous la peau de la face interne des cuisses. Aucun d'eux ne présentera le moindre trouble.

Enfin, la pulpe cérébrale elle-même est incorporée à l'excipient lanoline + huile de vaseline, mais du mélange gras on fait deux parts ; l'une à laquelle on ajoute du formol comme dans les essais antérieurs, l'autre qui ne contiendra pas de formol. Ces deux préparations sont maintenues pendant quatre heures à la température du laboratoire, puis déposées au réfrigérateur à 6°. Deux semaines plus tard, on procède aux inoculations après avoir laissé les mélanges se fluidifier à la température ordinaire.

1° Trois porcelets, n^{os} 367, 347 et 352, reçoivent à la dose de 10 ml sous la peau des cuisses le virus en excipient gras formolé ; ils commencent à présenter des troubles huit, dix et dix jours après respectivement ; la mort se produit dix et quatorze jours après l'inoculation chez 367 et 352 ; on sacrifie 347 *in extremis* quatorze jours après l'inoculation.

2° Trois porcelets, n^{os} 368, 346 et 356 reçoivent de la même façon 10 ml du virus en excipient gras non formolé ; ils présentent les premiers symptômes huit jours après, tous les trois ; les deux derniers

sont sacrifiés *in extremis* deux jours plus tard, le premier meurt treize jours après l'inoculation.

Les examens histopathologiques de l'encéphale et de la moelle lombaire ont montré de très belles lésions d'encéphalomyélite chez tous ces animaux, moins importantes cependant chez 352.

De ces constatations, il est permis de conclure que la présence du formol n'est ni suffisante ni nécessaire pour conférer au virus l'aptitude à provoquer la maladie après inoculation sous-cutanée. Mais nous inclinons à penser qu'elle favorise le phénomène parce que, dans d'autres essais comparatifs, nous avons vu les sujets inoculés avec le mélange gras formolé succomber, tandis que les autres résistaient ou restaient indifférents.

Les mélanges gras de pulpe cérébrale employés dans ces diverses expériences contenaient, approximativement, en millilitre, 1 000 unités létales par voie intracérébrale ; chaque sujet recevait donc sous la peau 10 000 doses environ ; on ne saurait douter, si l'on tient compte de la faible résorbabilité du mélange et de la brièveté de la période d'incubation dans la plupart des cas, qu'une petite partie seulement de ce virus entre en jeu pour déclencher le processus pathologique, celle, sans doute, qui, autour du point d'inoculation, se trouve au contact direct des tissus dans les heures qui suivent l'injection ; l'expérience suivante apporte quelques précisions sur ce point :

Le broyat de deux encéphales de porcs atteints d'encéphalomyélite est d'abord titré par inoculation à des porcelets : les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} sont injectées à deux animaux, chacune par voie cérébrale sous le volume de 0,25 ml de chaque côté du crâne ; les deux porcelets qui ont reçu la dilution 10^{-3} (nos 314 et 315) présentent les premiers signes neuf et dix jours après ; on les sacrifie *in extremis* dix et quinze jours après l'inoculation ; ceux qui ont reçu la dilution 10^{-4} (nos 318 et 319) manifestent les premiers troubles dix jours après ; on les sacrifie *in extremis* onze et treize jours après l'inoculation ; enfin, des deux qui ont reçu la dilution 10^{-5} (nos 325 et 324), l'un présente les premiers troubles dix-huit jours et meurt vingt-trois jours après l'inoculation, l'autre présente des troubles locomoteurs discrets et guérit.

Le même broyat est employé à préparer une suspension grasse formolée selon la formule indiquée plus haut et ce mélange gras est immédiatement injecté par voie hypodermique à trois porcelets, aux doses respectives de 8 ml, 4 ml et 2 ml, réparties en deux points ; le premier (n° 312) est trouvé en décubitus latéral huit jours après et meurt le lendemain ; le deuxième (n° 317) meurt subitement dans le délai de quinze jours ; le troisième (n° 329) est trouvé en décubitus latéral le vingt-troisième jour ; on le sacrifie *in extremis* le vingt-cinquième jour.

Les résultats des examens histopathologiques ont été tout à fait comparables chez ces divers sujets : encéphalomyélite avec réaction encéphalitique intense ; une exception doit être faite pour le porc 317,

mort subitement, chez lequel la lésion dominante consistait en infiltrats périvasculaires, la réaction encéphalitique restant dans l'ensemble très discrète.

Il se pourrait donc qu'il y ait une certaine corrélation entre la dose inoculée et la durée d'évolution, après inoculation hypodermique, comme après inoculation intracérébrale. Quoi qu'il en soit, en raison même de la faible proportion de virus qui intervient dans le processus, il est nécessaire que le mélange gras contienne un certain nombre d'unités virulentes ; dans des essais comportant l'emploi de substance cérébrale d'un titre inférieur à 10^2 nous n'avons pas observé l'évolution si nettement caractérisée et souvent brutale de la maladie. Chez certains sujets aucune manifestation n'était décelable ; chez d'autres on enregistrait des troubles seulement ébauchés : modification de l'habitus, hyperthermie légère, parésie.

Nous avons réussi, mais dans quelques cas seulement, à provoquer la maladie en injectant sous la peau de la pulpe virulente mise en suspension dans l'excipient huileux mayoline + arlacel, additionné de formol. Il est possible que dans ce mélange très fluide le formol exerce son action virulicide plus rapidement que dans l'excipient à base de lanoline. L'expérience suivante, la première en date dans nos essais, était instructive.

Le 22 octobre 1957, trois jeunes porcs de 7 mois, n^{os} 43, 45 et 46, reçoivent respectivement sous la peau des cuisses 3 ml au total, 6 ml et 9 ml du matériel virulent incorporé à l'excipient huileux formolé préparé onze jours avant et qui a été conservé à 6° après avoir subi un étuvage de vingt-quatre heures. Le n^o 45 commence à présenter des troubles le onzième jour et il meurt le douzième ; le n^o 43 présente des troubles de l'équilibre avec chute le douzième jour ; on lui fait une injection de cortisone et son état s'améliore ; trois semaines après il fait une poussée fébrile de trois jours, puis se rétablit. Quant au n^o 46, il est trouvé en décubitus latéral quatre-vingt-quinze jours après l'injection ; il présente une violente congestion du tégument d'apparence érythémateuse et une dyspnée très accusée ; celle-ci allant croissant, on le sacrifie le centième jour ; sa température s'est élevée jusqu'à 41°9.

Voici d'abord le résultat des examens histopathologiques concernant le n^o 45, mort le douzième jour : à trois niveaux espacés de la moelle, lésions de poliomyélite débordant les cornes antérieures et postérieures avec neuronophagie et satellitose ; manchons périvasculaires dans la substance blanche ; un petit ramollissement hémorragique dans la substance grise. Et voici les résultats concernant le n^o 46 sacrifié le centième jour : méningo-encéphalomyélite extrêmement intense et diffuse, intéressant tous les étages du névraxe avec une égale intensité et tous les petits vaisseaux qui sont entourés de cellules inflammatoires où prédominent les polynucléaires et les monocytes ; des neurones sont altérés, mais moins dans la corne d'Ammon, le cervelet

et le bulbe que dans la moelle, où l'aspect de poliomyélite est typique. Ce qui frappe, ce sont les lésions anciennes des méninges et surtout des plexus choroïdes des ventricules ; ceux-ci sont fibrino-inflammatoires ; la sclérose remaniée y est intimement liée à des plages infectieuses qui altèrent les cellules choroïdes et les vaisseaux.

Chez ce dernier animal nous avons pensé à un réveil de la poliomyélite par une infection grippale, mais les examens pratiqués n'ont pas permis d'établir le bien-fondé de cette hypothèse ; il s'agissait d'une encéphalomyélite à incubation exceptionnellement longue.

D'une manière générale, nous le rappelons ici, dans le processus pathologique faisant suite à l'injection de virus en excipient gras, la symptomatologie est tout à fait classique avec incubation souvent courte, prodromes assez brefs, phénomènes d'excitation et paralysies diversement associés traduisant l'atteinte des méninges et des centres nerveux aux différents étages. La maladie évolue sous forme aiguë ou subaiguë le plus souvent ; les cas de mort foudroyante ne sont pas rares ; au contraire, le passage à la chronicité ne s'observe guère. La température s'élève fréquemment jusqu'à 41°, 41°5 et l'on a pu noter 42°8 chez le porc 283 âgé d'un an ; l'hypothermie finale est presque de règle en dehors des évolutions très rapides.

ESSAI D'INTERPRÉTATION DES FAITS.

Ainsi le virus de Teschen incorporé à un adjuvant gras et injecté dans le tissu conjonctif sous-cutané du porc est susceptible de provoquer dans les délais habituels des manifestations pathologiques caractérisées ; l'encéphalomyélite ne diffère alors ni dans son processus, ni dans sa gravité de la maladie déterminée par l'inoculation intracérébrale du virus en suspension aqueuse ; on a même parfois le sentiment que l'évolution est plus brutale après l'injection sous-cutanée du virus en excipient gras. Quant aux altérations histopathologiques du névraxe, elles sont, dans leur diversité, tout à fait classiques et le plus souvent bien caractérisées. Il est particulièrement remarquable que, par ce procédé, l'on puisse tuer le porc adulte dont la résistance à la contamination et à l'inoculation est bien établie : il faut ajouter enfin que la présence dans le mélange gras d'une quantité de formol représentant environ 7 p. 1 000 de la substance nerveuse employée ne contrarie pas l'action du virus.

Or, injecté en suspension aqueuse par voie hypodermique, le virus de Teschen ne se montre qu'exceptionnellement capable de déclencher la maladie. L'encéphalomyélite enzootique des porcs se transmet dans les conditions naturelles par voie digestive et par voie nasale : expérimentalement, l'inoculation intracérébrale

assure la transmission dans à peu près 100 p. 100 des cas ; les inoculations dans la chambre antérieure de l'œil et dans le canal rachidien donnent des résultats analogues ; les instillations nasales et l'administration *per os* sont moins régulièrement opérantes ; les injections intracutanées, sous-cutanées, intramusculaires et intrapéritonéales échouent presque toujours. Au surplus, les meilleurs de ces procédés ne donnent des résultats constants que chez les porcelets ; ils sont d'autant moins fidèles que les sujets sont moins jeunes, et généralement inopérants chez les adultes.

Les constatations faites au cours de nos expériences sont donc en contradiction avec les faits habituellement observés ; incorporé à un excipient gras, le virus de la poliomyélite infectieuse du porc voit son pouvoir létal s'exalter au sein du tissu conjonctif, il diffuse dans l'organisme et atteint les divers segments des centres nerveux ; cela dans des délais n'excédant pas ceux que comporte l'infection par voie cérébrale et qui peuvent même leur être inférieurs dans les essais comparatifs. Il s'agit bien là d'un phénomène d'exaltation du pouvoir pathogène par action d'un adjuvant ; comment l'expliquer ?

L'encéphalomyélite enzootique des porcs a fait l'objet d'études expérimentales sans doute nombreuses et importantes, mais encore relativement limitées ; cela tient à ce que, sous sa forme évolutive, sous la forme clinique, la maladie ne sévit qu'en un petit nombre de pays ; cela tient aussi à ce que, le porc étant le seul animal réceptif au virus, les recherches n'ont pu prendre en cette matière l'ampleur que permettrait son inoculation aux petites espèces de laboratoire. Aussi bien ne trouve-t-on pas dans la littérature spécialisée de documents propres à éclairer la question. En revanche, la pathogénie de la poliomyélite humaine a retenu l'attention de nombreux expérimentateurs et de nombreux cliniciens depuis le début du siècle. Or, maladie de Heine-Medin et maladie de Teschen offrent de très grandes ressemblances ; leurs agents respectifs ont assez d'analogies pour que, récemment, Patočka, Kubelka et Korych aient cru pouvoir tirer de la comparaison de leurs propriétés biologiques et pathologiques, la conclusion qu'ils forment un groupe commun [1] ; il était indiqué de rechercher de ce côté les éclaircissements désirables.

Dans l'exposé qu'il a consacré à la poliomyélite infectieuse épidémique dans *Ultravirus des maladies humaines* [2], C. Levaditi aborde les problèmes qui nous intéressent ici, discute les arguments en présence, et propose les déductions que lui suggère sa parfaite connaissance du sujet. Nous en retiendrons deux notions essentielles pour ce qui nous concerne : 1° il est exceptionnel que la dispersion du virus s'effectue lorsqu'il a été introduit dans le système vasculaire périphérique ; d'ailleurs, dans les circonstances habituelles, il ne franchit pas la barrière

hémato-encéphalique ; 2° le virus est nettement lymphotrope, et tout traumatisme intéressant le système lymphatique (de la gorge, sa voie d'accès dans les conditions naturelles) favorise l'éclosion de la maladie. Et nous compléterons cet emprunt par la transcription des conclusions de l'auteur : « *Il est fort probable, sinon absolument certain, que la dispersion du virus poliomyélitique se fait le long des connexions nerveuses, et cette neuroprobiasie paraît s'effectuer soit par les cylindraxes, soit, plutôt, par le système lymphatique intra et péri-nerveux.* »

En transposant ces considérations, nous sommes amenés à penser qu'à la faveur d'une effraction des filets nerveux, le virus pénètre dans le réseau lymphatique qui leur est propre et se propage ensuite par voie centripète vers les centres nerveux. Or, on sait que, comme la plupart des substances dites adjuvantes, les excipients gras ou huileux, à base de lanoline ou d'huile de paraffine, suscitent dans le tissu hypodermique, une réaction inflammatoire qui entraîne assez habituellement la formation d'un granulome par corps étranger ; et il est à présumer que de tels désordres histologiques ne respectent pas l'intégrité du réseau nerveux. Pour en juger, nous avons examiné les coupes de lambeaux de peau prélevés, avec le tissu cellulaire sous-jacent, aux points d'injection des mélanges gras virulents et les débordant. Voici deux lectures choisies parmi les plus significatives :

Porcelet 341 : a présenté les premiers symptômes onze jours après l'inoculation (excitation violente puis paralysie) et est mort le lendemain. Dans le tissu cellulo-adipeux sous-cutané, un granulome inflammatoire, qui n'a pas encore subi l'évolution fibreuse ; les nerfs englobés dans la réaction inflammatoire sont complètement détruits ; à la périphérie du foyer principal dans les petits troncs vasculo-nerveux aboutissant aux corpuscules tactiles de la région dermique, on observe une dégénérescence des nerfs s'accompagnant d'une réaction inflammatoire discrète.

Porcelet 351 : a présenté les premiers symptômes huit jours après l'inoculation (troubles nerveux divers avec hyperthermie, puis paralysie) et est mort trois jours plus tard. Foyer inflammatoire dans l'hypoderme à un stade assez avancé pour qu'il soit difficile d'y mettre en évidence les lésions nerveuses ; mais au sein du tissu cellulo-adipeux en zone apparemment saine, il existe, à côté d'un faisceau vasculaire, une petite masse tumorale possédant les caractères histologiques d'un névrome.

Les deux porcs dont il est question ici, avaient reçu le virus incorporé à de la lanoline ; de semblables examens pratiqués après injection sous-cutanée de virus mis en suspension dans la mayoline, n'ont pas permis de déceler des lésions nerveuses aussi caractérisées ; la réaction cellulaire à la lanoline fluidifiée dans

l'huile de paraffine est plus vive que celle qui suit l'injection de cette huile seule ; c'est peut-être encore une raison pour que nous ayons provoqué plus facilement la maladie en utilisant la lanoline.

Quoi qu'il en soit, ces constatations sont en faveur de l'hypothèse émise. Néanmoins, nous avons envisagé une autre éventualité : celle du transport du virus par des gouttelettes de graisse ou d'huile. Etudiant la pathogénie de l'encéphalomyélite dite « allergique » provoquée par les extraits de substances cérébrales incorporés à un excipient gras additionné de bacilles tuberculeux tués, Constantinesco et coll. [3] ont relevé la présence de vésicules d'huile dans les placards méningés constitués par des cellules épithélioïdes et des lymphocytes ; mais il s'agissait d'examen pratiqués six semaines au moins après l'injection, délai semble-t-il nécessaire pour que s'effectue la dispersion des lipides. De tels amas d'huile ont été recherchés, mais en vain, dans les méninges de nos animaux ; compte tenu de la brièveté de la période d'incubation chez la plupart d'entre eux et de l'aspect même des méninges, nous croyons pouvoir écarter cette explication.

Il resterait à expliquer et à préciser le rôle éventuel du formol dont nous inclinierions à considérer la présence comme un facteur favorisant, tout au moins dans certaines conditions. Très rares sont les références qu'on puisse invoquer sur ce point particulier. Au cours de leurs recherches sur la diphtérie, Roux et Yersin avaient constaté l'apparition de paralysies des membres chez des cobayes après inoculation de faibles doses de culture ; Ramon et Debré obtinrent plus régulièrement le même résultat et dans de courts délais en injectant de la toxine diphtérique additionnée de 4 p. 1 000 de formol et maintenue quatre ou cinq jours à l'étuve à 37°. Il est probable que l'effet irritant *in situ* du formol favorise l'action de la toxine sur les nerfs du cobaye : il se pourrait que par un mécanisme analogue, dans nos expériences, il renforce l'agression que subissent les nerfs de l'hypoderme.

RÉSUMÉ.

L'inoculation hypodermique du virus de l'encéphalomyélite enzootique des pores, d'ordinaire sans effets apparents, est susceptible de provoquer l'éclosion de la maladie lorsque la matière virulente est incorporée à un adjuvant puissant, tel que la lanoline diluée dans de l'huile de paraffine. L'addition de formol au mélange, dans la proportion de 7 p. 1 000 de la substance nerveuse, ne contrarie pas le phénomène et semblerait plutôt le favoriser dans les conditions où nous avons expérimenté. Il

apparaît d'autre part, que le pouvoir pathogène du virus se trouve plus sûrement exalté, à égalité d'unités létales, lorsque la matière cérébrale est incorporée brute, qu'après dilution dans l'eau.

Les manifestations pathologiques consécutives à l'inoculation sous-cutanée du virus en mélange gras, sont tout à fait comparables dans leur chronologie, leur expression clinique et histologique, leur gravité, à celles qui suivent l'inoculation du virus dans l'encéphale.

Il est permis de penser que dès le début de la réaction inflammatoire suscitée par l'adjuvant, les nerfs du tissu cellulo-adipeux sont lésés et que le virus lié au lipide pénètre par effraction dans le réseau lymphatique péri- et intra-nerveux, puis, y diffuse et gagne plus ou moins rapidement les centres par voie centripète. Cette explication n'a que la valeur d'une hypothèse, mais elle nous paraît plausible.

En tout état de cause, il s'agit là, d'un exemple rare d'exaltation du pouvoir pathogène d'un virus.

SUMMARY.

ENHANCEMENT OF PATHOGENICITY OF ENZOOTIC SWINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS INOCULATED SUBCUTANEOUSLY,

The subcutaneous injection of enzootic swine encephalomyelitis virus generally yields only negative results. When a potent adjuvant, such as lanoline diluted in paraffin oil, is added to the virus, the same injection may provoke the disease. The addition of formol to the mixture virus + adjuvant does not inhibit the phenomenon; on the contrary it seems to favour its appearance. Besides, the enhancement of virulence is more easily obtained (the lethal dose being the same) when the adjuvant is added to the crude cerebral material than when it is added to the same material after its dilution in water.

The pathological symptoms following subcutaneous injection of the mixture virus + adjuvant are quite similar (chronology, clinical and histological manifestations, severity) to those following the intracerebral injection of the virus.

These findings suggest that from the beginning of the inflammatory reaction provoked by the adjuvant the nerves of the cellular fat tissue are altered, and the virus bound to the lipid enters the peri- and intranervous lymphatic network, where it diffuses and reaches the nervous centers more or less rapidly.

This is only an hypothesis, but it appears plausible. In any case, the results constitute a rare example of enhancement of a virus pathogenicity.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PATOCKA (F.), KUBELKA (V. L.) et KORYCH (B.). *J. Hyg. Epid. Microb. Imm.*, Prague, 1959, **3**, 1.
 - [2] LEVADITI (C.) et LÉPINE (P.). *Les ultravirus des maladies humaines*. 2^e édit., Maloine, Paris, 1945, 651.
 - [3] CONSTANTINESCO (N.), HORNET (Th.), BIRZU (N.), ZAVATE (O.), PENCEA (I.) et RUSAN (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 79.
-

**RÉSULTATS DE L'ISOLEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX
DANS 55.000 CRACHATS
PAR LE TEEPOL 410 BASIQUE
INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE**

par A. TACQUET et F. TISON (*).

(Institut Pasteur de Lille)

La technique d'isolement du bacille tuberculeux à l'aide du Teepol, publiée par l'un de nous en 1954 [1, 2] appliquée à 55 000 cultures et l'étude comparative prolongée de cette méthode avec d'autres techniques, nous ont permis de faire certaines constatations d'intérêt pratique qui complètent nos travaux antérieurs.

Nous ne reviendrons pas sur l'analyse critique des résultats, détaillée par ailleurs [3, 4, 5, 11] et reprise récemment par Colet-sos [6] : action du mouillant, de l'indicateur de pH, du sulfate de soude, du liquide de condensation, du coton de bouchage, etc.

Ce travail nous a été, avant tout, inspiré par les questions posées par certains biologistes français et étrangers, et par le désir d'éviter certaines erreurs susceptibles de nuire à l'efficacité de la méthode.

1° NATURE DU TENSIO-ACTIF. — Le Teepol sodique a été choisi après de nombreux essais comparatifs systématiques [7, 10] parmi les détergents anioniques, cationiques et non ioniques (1).

Le produit utilisé en France est un Teepol défini (T 410-alkyl-sulfate d'alcools gras secondaires). Les produits vendus sous le même nom dans d'autres pays n'ont pas toujours la même composition. C'est ainsi qu'un biologiste belge nous fit part des mauvais résultats obtenus dans son laboratoire. Renseignements pris, il utilisait le Teepol 414, contenant de l'alkylbenzène sulfonate de soude, donc de composition différente. L'emploi du produit T 410 entraîna la fin de ses ennuis.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 octobre 1960.

(1) Tous nos travaux sur ce sujet, échelonnés sur dix années, ont été fidèlement résumés dans la thèse de J. Audrin [11].

Tous les tensio-actifs essayés par nous depuis 1954 [10, 11] se sont révélés moins adaptés au but recherché que le Teepol 410. Aucune enzyme digestive ne nous a donné des résultats équivalents. Aucune base (phosphate trisodique, oxalate d'ammonium, etc.) n'a été supérieure à la soude à 1 p. 100.

2° NATURE DU MILIEU. — Pour les enquêtes que nous avons entreprises sous l'égide de l'O. M. S., deux techniques ont été utilisées sur deux échantillons des mêmes produits biologiques : la technique à la soude à 4 p. 100 et celle au Teepol. Cette étude comparative nous a confirmé la supériorité des résultats lorsque les produits traités avec le Teepol sont ensemencés sur milieu de Löwenstein-Jensen (20 p. 100 de gain). Par contre, après ensemencement sur milieux de Dubos (liquide ou solide), la croissance obtenue est parfois plus abondante pour les produits traités par la soude que pour ceux traités au Teepol. Parfois même, la culture est positive après traitement selon la technique de Petroff et négative par l'autre procédé.

Il y a donc lieu de penser que le petit résidu de substance active présent dans le culot de centrifugation ne présente pas d'inconvénient majeur [3] sur le milieu à l'œuf, mais peut être néfaste sur le milieu de Dubos.

Pour vérifier cette constatation nous avons effectué l'expérience suivante : des quantités de 0,6 mg (2), 2 mg et 10 mg de Teepol pur ont été ajoutées à des tubes de milieu de Löwenstein-Jensen, de Dubos liquide, contenant 100 mg de Tween 80 par litre de milieu, et Dubos solide. Tous ces tubes, ainsi que des tubes témoins sans Teepol, ont été ensemencés avec 0,01 mg d'une culture (huit jours) de H37Rv.

TABLEAU I. — Comparaison des cultures sur deux milieux solides et un milieu liquide de la souche H37 Rv (0,01 mg par tube) en présence de différentes concentrations de Teepol.

MILIEUX ÉTUDIÉS	TÉMOINS		TEEPOL EN MG PAR TUBE		
			0,6	2	10
Löwenstein-Jensen (0,75 % de glycérine)	+++	+++	+++	+++	+++
Dubos gélosé à 2 %	+++	+++	+++	+++	+++
Dubos liquide avec Tween 80	+++	+++	+++	+++	+++

(2) 0,6 mg est la quantité approximative de mouillant persistant dans l'inoculum obtenu par la technique habituelle.

Le pouvoir empêchant s'est révélé nul pour un ensemencement aussi riche.

Par contre, il n'en a pas été de même pour un inoculum pauvre : la même expérience a été réalisée en traitant par la soude des crachats pauci-bacillaires et en répartissant le culot en quantité sensiblement égale sur des milieux enrichis en Teepol aux concentrations précédemment indiquées.

La lecture du tableau II montre que si la culture n'est pas sensiblement inhibée par le Teepol sur milieu à l'œuf, elle l'est nettement sur milieu de Dubos gélosé. Aucune colonie n'a été obtenue en présence de 10 mg de Teepol.

TABLEAU II. — Nombre de colonies obtenues par ensemencement de crachats pauci-bacillaires sur milieux de Dubos gélosé et de Löwenstein, en présence de différentes concentrations de Teepol (lecture au vingt-huitième jour).

PRODUITS TRAITÉS PAR LA SOUDE A 4 %	MILIEU DE DUBOS GÉLOSÉ								MILIEU DE LOWENSTEIN							
	Témoin		mg de Teepol par tube						Témoin		mg de Teepol par tube					
			0,6		2		10				0,6		2		10	
Crachat I	3	2	1	0	0	0	0	0	0	5	5	0	2	2	6	0
Crachat II	20	22	10	0	5	6	0	0	100	50	50	50	100	50	50	50
Crachat III	∞	∞	50	60	0	0	0	0	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞

Cette étude confirme donc la nocivité d'un résidu de Teepol contenu dans les crachats ensemencés sur milieu de Dubos, alors que, dans les conditions habituelles, cette même concentration de détergent n'est pas sensiblement nocive, sur milieu à l'œuf [3].

Il semble même, selon la remarque de Coletos [6], que le pouvoir dispersif du tensio-actif, en formant des amas bacillaires plus petits, augmente le nombre de colonies.

Nous avons voulu vérifier si l'ion « lauryl sulfate » était, en dehors de toute impureté, responsable de cette mauvaise croissance sur milieu de Dubos.

Nous avons donc ajouté à des tubes de milieu de Löwenstein-Jensen et de Dubos gélosé du lauryl sulfate de sodium « pur pour analyse », aux concentrations de 0, 0,6, 2 et 10 mg.

Ces tubes ont été ensemencés avec un inoculum pauvre (10⁻⁵) de trois souches de bacilles tuberculeux et avec les culots de centrifugation de trois crachats pauci-bacillaires, traités selon la méthode de Petroff.

Le tableau III montre que, si l'action empêchante de ce corps

TABLEAU III. - Nombre moyen de colonies obtenues sur chaque tube de milieu de Löwenstein-Jensen et sur milieu de Dubos en présence de différentes concentrations de Teepol et de lauryl sulfate de sodium (culture au vingt-huitième jour).

PRODUITS TRAITÉS PAR LA SOUDE A 4 %	MILIEUX DE CULTURE	TUBES TÉMOINS	TEEPOL (en mg par tube)						LAURYL SULFATE DE SODIUM (en mg par tube)					
			0,6		2		10		0,6		2		10	
Crachat n° 1	Löwenstein- Jensen Dubos	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	50	50
		100	100	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
Crachat n° 2	Löwenstein- Jensen Dubos	100	100	100	100	100	0	0	100	100	0	0	0	0
		100	100	100	3	0	0	0	100	100	0	0	0	0
Crachat n° 3	Löwenstein- Jensen Dubos	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100	100
		100	100	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
Souche H ₃₇ Rv (10 ⁻⁵)	Löwenstein- Jensen Dubos	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	50	50
		100	100	100	10	4	0	0	100	100	10	8	0	1
Souche R ₁ Rv (10 ⁻⁵)	Löwenstein- Jensen Dubos	50	50	50	50	30	0	6	20	50	30	10	8	0
		30	30	0	6	0	0	0	10	10	0	0	0	0
Souche M (10 ⁻⁵)	Löwenstein- Jensen Dubos	100	100	100	100	100	0	0	100	100	50	50	30	50
		100	100	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0

est un peu inférieure (3) à celle du Teepol sur milieu de Löwen-Jensen, elle reste importante sur milieu de Dubos. Un résidu de 2 mg de produit actif par tube suffit en général à freiner ou empêcher la culture d'un petit ensemencement (4).

3° RÉSULTATS DE LA TECHNIQUE SUR MILIEU A L'ŒUF. — Si l'on tient compte des remarques précédentes concernant le choix du Teepol, la nature du milieu et si l'on se conforme strictement à la technique codifiée par ailleurs [2], les résultats sont bons. Certes, le procédé n'est pas à l'abri de certaines critiques [3, 6], mais, en pratique courante, il peut être considéré comme le moins mauvais quant à la *sensibilité, la rapidité et l'élimination des germes de souillure*.

Une comparaison très prolongée, faite en parallèle avec les autres techniques les plus courantes, montre un gain pouvant aller, dans les conditions habituelles, jusqu'à 20 p. 100 de résultats positifs supplémentaires.

Les contaminations des cultures sont rares, si l'on prend la précaution de faire d'abord le mélange crachat-Teepol dans un premier récipient et de le transvaser ensuite pour agitation dans un tube à centrifuger stérile, afin d'éviter la souillure des parois des tubes servant à l'homogénéisation. Dans ces conditions, sur les 1 000 premières cultures de l'année 1960, 6 seulement ont été contaminées par des germes indésirables, alors que beaucoup de ces produits avaient mis plusieurs jours et certains (en provenance d'outre-mer) plusieurs semaines avant de parvenir au laboratoire. Ces chiffres peuvent paraître élevés en comparaison de ceux observés dans les laboratoires de sanatoria (moins de 1 p. 1 000) [8]. Ils sont la conséquence de la variété parfois surprenante des conditions de prélèvement et d'envoi.

CONCLUSION.

Cette étude de la méthode au Teepol-soude à 1 p. 100 nous a permis de faire les observations complémentaires suivantes :

1° Il est indispensable d'utiliser le détergent anionique T 410. D'autres produits de même nom, mais de composition différente, donnent des résultats peu satisfaisants.

2° Avec l'emploi de ce détergent, le milieu de Löwenstein-Jensen, glyciné ou non, est préférable à certains milieux synthé-

(3) Cette constatation jointe au fait que le Teepol n'a plus désormais une formule définie, nous a incités à étudier actuellement une technique utilisant le lauryl sulfate de sodium pur alcalin.

(4) Nous nous efforçons actuellement de déterminer le mécanisme de cette action.

tiques, milieu de Dubos solide ou liquide par exemple, qui ne permettent pas d'obtenir, dans nos conditions techniques, une croissance favorable des bacilles tuberculeux.

Les précautions à observer au cours des manipulations sont rappelées ainsi que les résultats obtenus sur 55 000 produits biologiques. Cette méthode nous paraît la moins agressive pour les Mycobactéries de celles actuellement proposées, mais il ne fait aucun doute que de nouveaux perfectionnements pourront lui être apportés dans l'avenir.

SUMMARY

ISOLATION OF TUBERCLE BACILLI IN 55 000 SPUTUM SPECIMENS BY MEANS OF BASIC 410 TEEPOL. INFLUENCE OF THE CULTURE MEDIUM.

The studies carried out by means of Teepol + 1 p. 100 soda, demonstrate the following facts :

1. The use of the anionic detergent T 410 is absolutely necessary ; other products having the same name but a different constitution, yield unsatisfactory results.

2. With this detergent, the Löwenstein-Jensen medium (with or without glycerin) yields better results than certain synthetic media (Dubos' solid or liquid medium, for example) which do not allow, in the conditions of the experiments, a good development of the bacilli.

The precautions to be taken during the experiments and the results obtained with 55 000 biological specimens are described.

The method appears the least aggressive one among the techniques actually proposed, but it is certainly to be improved in the future.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TISON (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 735.
- [2] TISON (F.). *Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux. Techniques de laboratoire*. Masson, édit., Paris, 1956.
- [3] TISON (F.) et AUDRIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 121.
- [4] TISON (F.). *Ann. Inst. Pasteur.*, 1952, **82**, 484.
- [5] TISON (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950 **78**, 800.
- [6] COLETOS (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 135.
- [7] TISON (F.) et LOZE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 445.
- [8] TISON (F.). *Ann. Inst. Pasteur.*, 1956, **90**, 507.
- [9] TISON (F.). *Rev. Tub.*, 1956, **20**, 231.
- [10] GERNEZ-RIEUX (Ch.), BETHOUART (J.) et TACQUET (A.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1957, **8**, 89.
- [11] AUDRIN (J.). *Thèse de Pharmacie*, Marseille, 1955.

LES PROPRIÉTÉS LYTQUES DU SÉRUM NORMAL

II. — OBSISTINE ET ANTIGÈNE VI D'*EBERTHELLA TYPHI*

par L. COLOBERT et A. KIRN (*).

(Laboratoire de Bactériologie
de la Section Technique de Recherches et d'Etudes
des Services de Santé des Armées, 108, Bd. Pinel, Lyon)

L'activité lytique de l'obsistine se manifeste sur un assez large éventail de bactéries à Gram négatif, mais non d'une manière homogène à l'intérieur des groupes taxonomiques. C'est ainsi que parmi les salmonelles, *Eberthella typhi* (souche O-901), *Salmonella para A* (durazzo), *Salmonella para B* (reading) sont lysées, alors que *Salmonella para C* (kunzendorf), *Salmonella newport* et *Salmonella enteritidis* ne le sont pas [5]. Pour vérifier si ces variations étaient en relation avec la structure antigénique, on a étudié l'effet de l'obsistine sur des souches d'*Eberthella typhi* différant entre elles par leur teneur en antigène Vi.

On a comparé une souche d'*E. typhi* en forme V (Vi-agglutinable, O-inagglutinable) récemment isolée par hémoculture au cours d'une typhoïde, à un variant en forme VW (Vi-agglutinable, O-agglutinable) que nous avons sélectionné à partir de celle-ci. Ces deux souches ont été d'autre part comparées à la souche en forme W, classique, O-901 (Vi-non agglutinable, O-agglutinable). Les conditions expérimentales pour l'observation de la lyse ont été précédemment décrites [5].

On a étudié sans constater de différences entre eux, 8 sérums de femmes pour lesquels on n'a pas, dans les antécédents, la notion de vaccination contre les salmonelloses ni la notion d'une affection à salmonelles, et également le sérum d'un homme vacciné plusieurs années auparavant. Aucun de ces sérums ne présentait d'anticorps agglutinants.

La figure 1 concrétise les observations. On voit que la lyse est intense, pratiquement totale, dans le cas de la souche en forme W ; elle est très partielle dans le cas de la souche en forme VW et très faible dans le cas de la souche en forme V.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 octobre 1960.

Il paraît donc que la présence de l'antigène Vi a un effet protecteur contre la lyse due à l'obsistine.

Il a paru intéressant de vérifier si cet effet se manifeste sur des bactéries en prolifération. A cet effet, on s'est servi de l'appareil de Bonét-Maury et Jouan (1) qui permet de suivre la croissance bactérienne, en milieu nutritif agité, par l'enregistrement de la turbidité. Les expériences ont été réalisées à 37° en eau

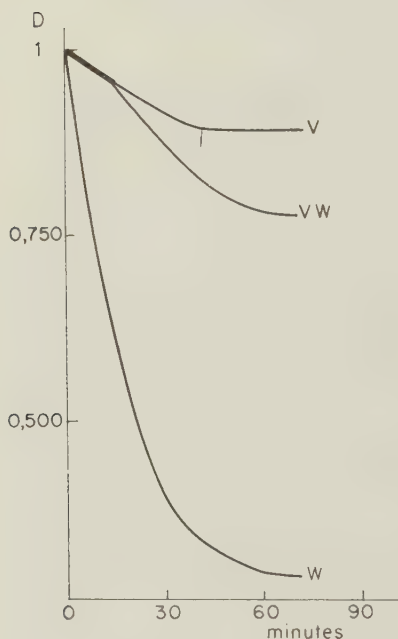


FIG. 1. — Lyse d'*Eberthella typhi* en forme V, VW et W par l'obsistine, dans les conditions de normalisation [5]. En abscisses le temps en minutes, en ordonnées la densité optique.

peptonée à 10 g p. 1 000 cm³. On introduit tout d'abord dans les cuves de l'appareil un volume convenable de ce milieu nutritif, puis on l'ensemence d'un nombre déterminé de bactéries en phase de croissance exponentielle. Au moment choisi, on complète à 10 cm³ avec le sérum à étudier.

Le figure 2 montre ce qui se passe avec la souche en forme W, quand le sérum est ajouté deux heures après le début de l'incubation. La densité optique de la culture a alors atteint la valeur *a*. L'addition du sérum a pour effet d'augmenter brusquement la densité optique qui atteint les valeurs *d*, *c*, *b*, *a*, respectivement pour des dilutions finales de sérum égales à 1/2, 1/4, 1/8, 1/10.

(1) Biophomètre enregistreur de Bonét-Maury et Jouan [3, 4]. Jouan, 113, boulevard Saint-Germain, Paris-6°.

Ce phénomène est dû à l'opalescence provoquée par la précipitation de certains éléments du milieu. Pour les dilutions de sérum égales à $1/2$ et $1/4$, on observe après une reprise momentanée de la croissance, une chute de la densité optique qui correspond à une lyse partielle des bactéries, suivie d'une nouvelle reprise de la croissance mais très ralentie. Pour les dilutions du sérum inférieures à $1/4$, la lyse ne se manifeste pas et la courbe de croissance ne diffère pas de celle du témoin qui n'a pas reçu de sérum.

Quand on fait appel dans les mêmes conditions à une souche

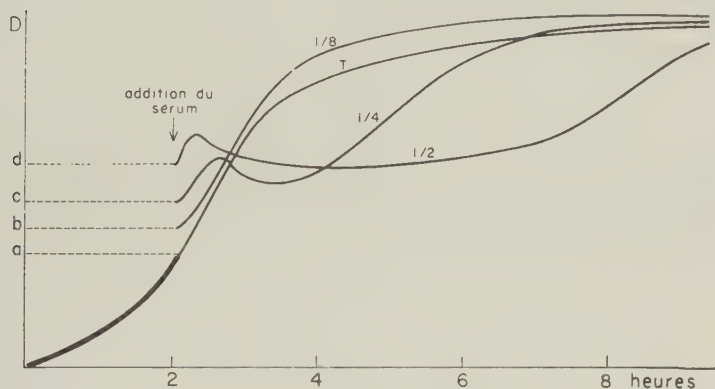


FIG. 2. — Influence de l'addition de sérum après deux heures de croissance d'*Eberthella typhi* en forme W. En abscisses le temps en heures, en ordonnées la densité optique. T croissance témoin en l'absence de sérum ; $1/2$, $1/4$, $1/8$ dilutions du sérum dans le milieu de culture.

en forme V, non seulement le phénomène de la lyse ne se manifeste pas, mais le taux de croissance ne paraît pas perturbé.

Ces expériences permettent donc de retrouver les différences observées sur les bactéries non proliférantes, différences que l'étude de l'effet du sérum sur un nombre de bactéries beaucoup plus faible va permettre de préciser.

Dans une série d'expériences, on a introduit le sérum dans les cuves, immédiatement après l'inoculation de 50 000 bactéries. La densité optique de départ est alors trop faible pour pouvoir être enregistrée. La figure 3 donne les résultats d'une expérience réalisée avec la souche en forme V. On reconnaît avant la phase exponentielle de croissance, une longue phase préliminaire qui n'est pas à proprement parler une phase de latence, mais une phase d'inhibition de la croissance car il s'y manifeste un début de développement suivi d'une lyse légère ; sa durée est d'autant

plus longue que la concentration du sérum est plus élevée. Il est remarquable qu'à une exception près, le taux de croissance pendant la phase exponentielle est très voisin de celui du témoin ne contenant pas de sérum. En somme, *dans le cas de la souche en forme V, tout se passe comme si, après une certaine durée,*

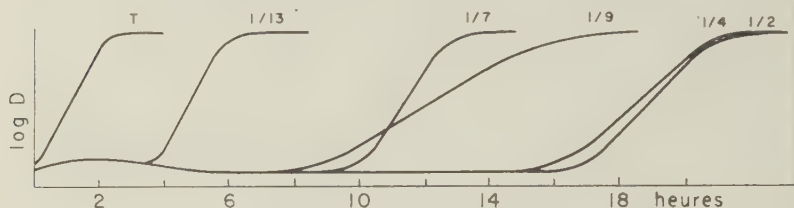


FIG. 3. — Croissance d'*Eberthella typhi* en forme V, en présence de dilutions de sérum égales à 1/2, 1/4, 1/7, 1/9, 1/13. T croissance en l'absence de sérum. En abscisses le temps en heures, en ordonnées le logarithme de la densité optique. La phase exponentielle de croissance est linéaire et la pente de la droite exprime le taux de croissance (nombre de générations par unité de temps).

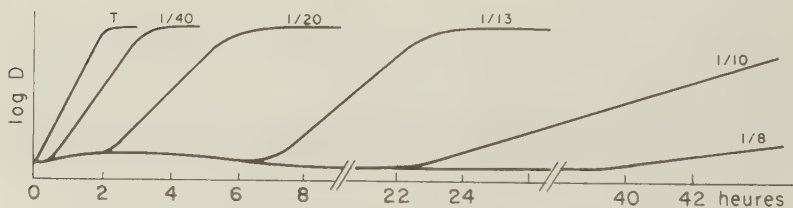


FIG. 4. — Croissance d'*Eberthella typhi* en forme W, en présence de dilutions diverses de sérum. Mêmes conventions que pour la fig. 3.

la croissance bactérienne échappait à l'influence de l'inhibiteur sérique.

On voit sur la figure 4 que les choses sont assez différentes lorsqu'on utilise la souche en forme W. On observe bien encore une période d'inhibition du développement d'autant plus longue que la concentration de sérum est plus élevée, mais le taux de croissance pendant la phase exponentielle est variable et d'autant plus faible que la concentration de sérum est plus grande. Lorsque le nombre de bactéries inoculées est assez faible (500 bactéries), on peut obtenir une inhibition définitive aussi bien avec la souche en forme V qu'avec celle en forme W.

INTERPRÉTATION.

Les observations du développement d'*E. typhi* en forme V ou W, en présence de sérum dilué, peuvent s'interpréter par le fait que l'antigène Vi protège contre la lyse par l'obsistine. En effet, l'antigène Vi est un antigène de surface que Wilson et Miles ont rapproché des antigènes K des coliformes [8]. Il semble même qu'il constitue une microcapsule autour des bactéries comme Bhatnagar et coll. [2] l'ont montré dès 1938, et plus récemment, Ando et Nakamura [4]. Shimoyo a montré que si toutes les souches capsulées ne possèdent pas d'antigène Vi, en revanche, toutes celles qui possèdent cet antigène ont également une capsule lorsqu'elles sont en forme V. Les formes W n'ont pas de capsule. Quant aux formes V W, elles représentent un mélange de bactéries capsulées et non capsulées [7].

D'autre part, on sait que la dissociation V W à partir d'une souche en forme V donnée est fréquente, surtout dans certaines conditions métaboliques, si bien qu'on peut se représenter une population d'*Eberthella typhi* à un instant donné comme un mélange de bactéries microcapsulées et de bactéries non capsulées en proportion variable, les premières et les secondes étant respectivement en proportion très faible dans les souches en forme W et V.

L'existence d'une longue période d'inhibition de la croissance dans le cas d'une souche en forme V, est la preuve qu'il existe quelque phase au cours du développement de chaque bactérie, où l'obsistine est capable d'agir efficacement. On peut supposer que cette phase se situe au moment de la division, lorsque les deux cellules-filles se séparent et ne sont peut-être pas encore totalement enveloppées de la microcapsule Vi. Quoi qu'il en soit, l'efficacité de l'obsistine sur la souche en forme V comme sur la souche en forme W, dépend de la concentration de celle-ci ; en effet, la période d'inhibition est d'autant plus longue que la concentration en sérum est plus élevée. Nous avons montré [5] que l'obsistine n'agit pas à la manière d'une enzyme et disparaît du milieu réactionnel au fur et à mesure de la lyse des bactéries. On peut imaginer que le développement microbien échappe à l'obsistine au moment où le taux de celle-ci atteint une valeur minimum critique, ce qui sera d'autant plus rapidement atteint que le nombre initial de bactéries aura été plus élevé.

Dans le cas de la souche W, lorsque l'échappement de la croissance se produit, celui-ci a toute chance de se faire par sélection au profit des variants Vi [6]. Si ces variants sont en forme V, c'est-à-dire si à chaque instant du développement, la totalité des bactéries est pourvue d'antigène Vi, le taux de croissance

sera nécessairement voisin de celui de la culture témoin ; c'est effectivement ce qui se passe dans le cas correspondant à la figure 3 où la souche incubée était déjà à l'origine en forme V. Mais si le variant Vi responsable de l'échappement est en forme V W, c'est-à-dire donne à chaque génération un pourcentage élevé de bactéries dépourvues d'antigène Vi et sensibles à l'obsistine, la concentration de cette dernière est encore suffisante pour détruire les bactéries dépourvues d'antigène Vi. Le taux de croissance se trouve donc diminué. C'est ce qu'on observe à la figure 4 où la souche inoculée à l'origine était en forme W, et également dans un cas sur la figure 3.

Cette interprétation pourrait éclairer d'un jour nouveau la pathogénie de la fièvre typhoïde. On a fait remarquer depuis longtemps que dans cette maladie, la durée considérable de la phase d'invasion, le petit nombre de bactéries en circulation dans le sang, la guérison spontanée fréquente témoignent d'un certain degré de résistance naturelle ; il est tentant d'établir un parallélisme avec le phénomène d'échappement à l'obsistine. Il devient également facile de comprendre l'importance de l'antigène Vi en tant que facteur de virulence. De plus, il est possible d'entrevoir une application dans la pratique des hémocultures. Dans les salmonelloses, tous les bactériologistes savent combien les hémocultures démarrent difficilement, surtout pendant la période d'état de la maladie(2). Ils cherchent à en faciliter le départ en ensemençant le sang virulent dans un volume élevé de bouillon nutritif, et procèdent de plus à des repiquages aveugles successifs. Si le facteur inhibiteur de la croissance est l'obsistine comme il nous paraît probable, il suffirait, pour bloquer l'activité de celle-ci, d'introduire dans le bouillon nutritif, une quantité de calcium ou de magnésium suffisante pour obtenir une concentration finale de 100 mg p. 1 000 cm³ (3).

CONCLUSION.

L'antigène Vi protège *Eberthella typhi* contre la lyse par l'obsistine. Ce fait permet d'expliquer les caractères de la culture de cette bactérie en présence de sérum dilué, et de mieux comprendre la pathogénie de la fièvre typhoïde.

(2) Les malades à la période d'état ont un taux relativement élevé d'obsistine dans le sang. Nous avons des raisons de penser que la septicémie a pour effet de susciter une augmentation du taux d'obsistine. La maladie apparaîtrait ainsi comme une course entre la virulence bactérienne et l'obsistine.

(3) Il faudrait tenir compte de la quantité de calcium nécessaire pour précipiter les phosphates du bouillon.

SUMMARY.

LYTIC PROPERTIES OF NORMAL SERUM.

 II. OBSISTIN AND Vi ANTIGEN OF *Eberthella typhi*.

The Vi antigen protects *E. typhi* against lysis by obsistin. This fact allows to explain the cultural characters of this bacterium in presence of diluted serum, and affords a better understanding of typhoid fever pathogenesis.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDO (K.) et NAKAMURA (Y.). *Jap. J. exp. Med.*, 1950, **21**, 41.
 - [2] BHATNAGAR (S. S.), SPEECHLY (C. G.) et SINGH (M.). *J. Hyg.*, 1938, **38**, 663.
 - [3] BONÉT-MAURY (P.) et WALEN (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1945, **71**, 284.
 - [4] BONÉT-MAURY (P.) et PERAULT (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1945, **71**, 425.
 - [5] COLOBERT (L.) et KIRN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 69.
 - [6] JUDE (A.) et NICOLLE (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 1744.
 - [7] SHIMOJO. *Jap. J. exp. Med.*, 1951, **21**, 159.
 - [8] WILSON (G. S.) et MILES (A. A.). In *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, **4**, 763, Arnold, édit., Londres, 1955.
-

NEISSERIA MUCOSA (DIPLOCOCCUS MUCOSUS LINGELSHEIM)

II. — ÉTUDE ANTIGÉNIQUE ET CLASSIFICATION

par M. VÉRON, P. THIBAUT et L. SECOND (*).

(Service de Microbie Technique, Institut Pasteur, Paris)

Nous avons décrit antérieurement [1] les caractères morphologiques et culturels d'un coque Gram négatif, entouré d'une épaisse gangue muqueuse, aérobie strict, mais réduisant activement, en anaérobiose, les nitrates en azote gazeux, isolé principalement dans les affections du rhinopharynx de l'homme, et pathogène dans certaines conditions pour la souris. Nous avons proposé pour ce germe le nom de *Neisseria mucosa* (*Diplococcus mucosus* Lingelsheim) pour éviter la création d'une espèce nouvelle, et, si possible, faire cesser la confusion existant probablement entre ce genre et d'autres bactéries, telles que *B. anitratum* (*Moraxella glucidolytica*).

Notre travail actuel porte sur l'étude des antigènes de *N. mucosa* et sur le diagnostic pratique du type sérologique de ces germes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1° ORIGINE DES SOUCHES ÉTUDIÉES. — Toutes les souches proviennent de matériel humain. Nous avons étudié 10 souches de *N. mucosa* dont 5 souches (X34, X68, X71, N16, Pat) décrites précédemment [1] ; les 5 autres souches ont été identifiées plus récemment. Trois souches (Man, Por, Fal) ont été isolées de la gorge de malades souffrant de rhino-pharyngite ou d'amygdalite suppurées. Une souche (Vin) nous a été adressée de l'Institut Pasteur de Tanger par le Dr J. Vincent, qui l'a isolée, en culture pure, d'un liquide céphalo-rachidien purulent prélevé au cours d'une méningite aiguë survenue chez une jeune Arabe de 12 ans ; la malade guérit rapidement avec un traitement antibiotique associé comprenant pénicilline + streptomycine + sulfamides. La dernière souche, 5955, nous a été aimablement adressée par la NCTC avec la désignation suivante : « NCTC 4590, *Neisseria pharyngis*, flavus strain » ; cette souche présentant tous les caractères de *N. mucosa* a été rangée dans cette espèce.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 octobre 1960.

Quatre souches de *N. sicca* ont été étudiées : deux souches 52179 et 52183, de la Collection de l'Institut Pasteur, dues au Dr M. J. Pelczar Jr, qui les avait étudiées [2] sous les numéros 9913 et 1485 ; une souche, 52192, isolée par prélèvement de gorge de lésions pharyngiennes ; enfin, une souche, 5956, provenant aussi de la NCTC, et portant la désignation « NCTC 4591, *Neisseria pharyngis*, siccus strain ». Ces quatre souches sont aérobies strictes (sauf 52183 et 52192 qui cultivent aussi en anaérobiose en gélose-gélatine, mais sans production de gaz), donnent des colonies sèches ou grasses selon les milieux et les repiquages, ne sont pas pigmentées (sauf 5956 qui est jaune pâle), ne réduisent pas les nitrates, attaquent le glucose, le maltose, le lévulose (sauf 52179) et le saccharose.

En plus de ces souches de référence, nous avons utilisé comme témoins, de nombreuses souches de *Neisseria* isolées récemment ou provenant de collections, ainsi que des souches de *M. glucidolytica* (*B. anitratum*) et *M. lwoffii* (afermentaires).

Toutes les souches de *Neisseria* ont été conservées par cryodessiccation dès leur isolement ou leur réception dans notre laboratoire. Les subcultures ont été conservées à 30° C en gélose nutritive molle ensemencée par piqûre centrale ; dans ces conditions, un repiquage toutes les six ou huit semaines sur le même milieu est suffisant. On n'a pas conservé de subcultures au delà de quatre mois environ ; passé ce délai on est reparti, si nécessaire, d'une nouvelle semence cryodesséchée.

2° PRÉPARATION DES SUSPENSIONS ANTIGÉNIQUES. — Les germes d'une culture de vingt-quatre heures à 37° C sur une gélose nutritive ordinaire (peptone pepsique de viande) sont recueillis dans du tampon phosphate (M/20, pH 7,4) physiologique (0,48 p. 100 de ClNa) et formolé (0,3 p. 100 de formol commercial à 40 p. 100). La suspension est chauffée deux heures à 120° C à l'autoclave ; puis, avec du tampon neuf, les germes sont lavés deux fois énergiquement par agitation mécanique, centrifugés, et remis en suspension dans ce même tampon formolé, jusqu'à l'obtention d'une suspension d'opacité standard, correspondant à 100 unités à l'électrophotomètre Meunier (écran orangé). Une suspension de même densité optique de staphylocoques contient, d'après les numérations sur plaques, environ 2.10^8 bactéries vivantes/ml. Les suspensions de *Neisseria*, contenant beaucoup de germes morts et de nombreux agglutinats microbiens, se prêtent mal aux techniques de numération ; la suspension standardisée contient environ 2,25 mg/ml de *Neisseria* (poids sec).

Avec certaines souches très muqueuses (X68 par exemple), surtout après plusieurs repiquages sur gélose inclinée, le chauffage provoque une gélification de la suspension rendant impossible la sédimentation des germes par centrifugation. Dans ce cas, on évite ce phénomène en lavant soigneusement les germes avant le chauffage. Sinon, en faisant, sur le gel obtenu après chauffage, une hydrolyse poussée avec l'ammoniaque (pH = 12), après un contact de plusieurs heures avec agitation à la température ambiante, on peut obtenir un culot microbien appréciable par centrifugation. L'agglutinabilité de l'antigène thermostable résiste à des pH très alcalins (pH 9 à 12).

Les suspensions antigéniques formolées sont conservées à + 4° C.

3° PRÉPARATION DES SÉRUMS AGGLUTINANTS. — On utilise comme antigènes des suspensions formolées (et non chauffées) obtenues comme précédemment, mais sur un milieu préparé avec une peptone tryptique de caséine, pour éviter les fausses réactions sérologiques dues aux composants des milieux de culture. Les suspensions standardisées sont injectées au lapin selon le rythme préconisé par Warner, Faber et Pelczar [2]. Les immunosérums obtenus, antibactéries formolées et non chauffées (en abrégé, ABF) sont phéniqués à 0,5 p. 100 et conservés à + 4° C (l'acide phénique n'a pas d'action sur les agglutinations).

Des immunosérums anti-bactéries chauffées (en abrégé, ABC) ont été préparés de la même manière, mais avec des germes chauffés deux heures à 120° C.

4° TECHNIQUES D'AGGLUTINATION. — Deux techniques ont été utilisées, en tubes et sur lames.

Chaque tube reçoit 0,5 ml de sérum dilué à 1/10, 1/20, ... jusqu'à 1/5120 (plus un témoin avec 0,5 ml d'eau physiologique), puis 0,5 ml de suspension antigénique standardisée. Les tubes sont placés pendant la nuit à l'étuve à 37° C, et la lecture est faite le lendemain, mais seulement après séjour d'au moins quatre heures vers 25° C au sortir de l'étuve. Est considérée comme positive, toute réaction où l'agglutination se traduit : 1° avant agitation, par une clarification (comparée au tube témoin) et un dépôt des agglutinats recouvrant souvent tout le fond du tube ; 2° après agitation, par des agglutinats nets, cohérents, visibles à l'œil nu. On ne rencontre qu'exceptionnellement un phénomène de zone par excès d'anticorps. Par contre, un excès d'antigène se traduit par une diminution nette de la sensibilité de la réaction ; le maximum de sensibilité compatible avec une commodité suffisante de lecture est obtenu avec la concentration d'antigène préconisée plus haut.

Une technique d'agglutination de deux heures au bain-marie à 45° C, suivie d'un séjour de quatre à six heures à 25° C, donne des résultats semblables à la technique précédente. L'agglutination sur lames se fait avec des germes vivants prélevés directement sur gélose, ou avec des suspensions chauffées concentrées (ajoutées sous le même volume que le sérum) ; le titre donné correspond toujours à la dilution finale du sérum.

5° TECHNIQUES DE SATURATION DES AGGLUTININES. — Elles sont analogues à celles utilisées pour les entérobactéries. Les sérums sont saturés en deux fois, ou parfois trois fois (par agitation pendant une heure à 20° C à chaque fois), jusqu'à disparition des agglutinines homologues de la souche saturante.

RÉSULTATS.

1° ETUDE ANTIGÉNIQUE DES BACTÉRIES NON CHAUFFÉES. — L'agglutination directe sur lames des bactéries provenant de colonies sur gélose est pratiquement irréalisable et sans valeur. De même, les suspensions antigéniques préparées pour l'agglutination en

tubes avec les germes non chauffés, vivants ou simplement formolés, ne sont, en général, pas stables. Elles peuvent, en effet, être agglutinées par des sérums de lapins normaux à des titres atteignant parfois 1/1 280. Cette instabilité varie d'ailleurs beaucoup d'une subculture à l'autre.

Il est cependant possible, avec quelques suspensions restées stables, de constater les faits suivants : a) les agglutinations homologues atteignent un titre élevé (1/640 à 1/5 120), alors que les coagglutinines sont très variables, toujours inférieures aux agglutinations homologues et même souvent négatives ; b) la plupart des souches, agglutinées au 1/1 280 ou 1/2 560 par leur propre sérum ABF (anti-bactéries formolées) sont totalement inagglutinables dans leurs sérums ABC (anti-bactéries chauffées) homologues.

Ces faits, joints à la structure morphologique des germes, suggèrent la présence d'un antigène de surface constitué essentiellement de facteurs spécifiques de type et dont l'étude plus poussée n'a pas été entreprise. Cet antigène est, sans conteste, responsable de l'O-inagglutinabilité des bactéries non chauffées, ainsi qu'il ressort des expériences suivantes.

2° ETUDE ANTIGÉNIQUE DES BACTÉRIES CHAUFFÉES. — L'agglutinabilité de l'antigène de surface est thermolabile ; elle résiste à un chauffage d'une heure à 60° C, mais est plus ou moins détruite à partir de 80° C (Cf. tableau I, colonnes 1 et 2).

Un chauffage supérieur à 100° C pendant une heure démasque l'agglutinabilité d'un antigène thermostable, supposé somatique,

TABLEAU I. — Influence du chauffage des suspensions de *N. mucosa* sur leur agglutinabilité par les sérums homologues.

ANTIGÈNE chauffé pendant :	SÉRUMS ABF*		SÉRUMS ABC** Souche Pat
	Souche Pat	Souche Nr6	
Non chauffé	5 120§	1 280	—§§
1 h à 60°C	5 120	640	—
1 h à 80°C	320	80	—
1 h à 100°C	1 280	80	1 280
1 h à 120°C	2 560	640	1 280
2 h à 120°C	2 560	1 280	2 560

(*) Sérum ABF : sérum antibactéries formolées (non chauffées).

(**) Sérum ABC : sérum antibactéries chauffées 2 h à 120°C.

§ 5120 : la réaction est positive jusqu'à la dilution finale de 1/5120.

§§ — : la réaction est négative au 1/20.

(Ces indications sont valables également pour les tableaux suivants).

et que nous appellerons antigène O. Après chauffage de deux heures à 120° C, cet antigène somatique conserve ses propriétés antigéniques, mais les agglutinines ABC obtenues ne sont actives que lorsque le pouvoir de l'antigène de surface de rendre les bactéries O-inagglutinables a été détruit par un chauffage d'au moins une heure à 100° C (Cf. tableau I, colonne 3).

Avec les bactéries non chauffées, les agglutinats ont un caractère « muqueux », c'est-à-dire qu'ils sont assez gros, irréguliers, et relativement lâches. Par contre, avec les bactéries chauffées, les agglutinats sont du type O, c'est-à-dire fins, granuleux, réguliers et difficiles à dissocier. C'est un phénomène analogue à celui décrit par Habs pour *Pseudomonas aeruginosa* [3].

TABLEAU II. — Mise en évidence d'agglutinogènes thermostables communs entre certaines souches, après agglutination par un sérum anti-N16 ABF (antibactéries formolées, non chauffées).

ANTIGÈNES	X34	X68	X71	N16	Pat
Non chauffés	—	80	40	640	—
Chauffés 1 h à 100°C	—	40	160	80	—
Chauffés 2 h à 120°C	640	1 280	1 280	1 280	160

D'autre part, le chauffage progressif des suspensions bactériennes met en évidence, lorsque l'antigène de surface a été suffisamment éliminé, l'apparition de coagglutinines importantes entre certaines souches (Cf. tableau II), ce qui laisse prévoir la possibilité d'un groupage en sérotypes.

Les suspensions formolées de *N. mucosa* et *N. sicca* chauffées deux heures à 120° C sont stables, et se conservent pendant des mois à + 4° C. Elles sont, le plus souvent, inagglutinables par les sérums de lapins normaux, sauf quelques souches qui sont agglutinées au 1/40 ou plus rarement au 1/80. La saturation des sérums fait disparaître totalement ces agglutinins non spécifiques.

3° ETUDE DES SÉROTYPES. — Si le chauffage des bactéries ne leur fait pas perdre leur agglutinabilité, il altère cependant leur pouvoir antigénique, car les sérums ABC sont toujours, vis-à-vis des bactéries chauffées, d'un titre nettement inférieur au sérum ABF (sauf pour la souche Pat, Cf. tableau I). Nous avons donc utilisé, dans la suite de notre étude, uniquement des sérums ABF. Les résultats des agglutinations croisées entre souches de *N. mucosa* sont reportés dans la partie supérieure gauche du tableau III. Il apparaît sur ce tableau que 8 souches sur 10

TABLEAU III. — Agglutinations croisées entre *N. mucosa* et *N. sicca*
(Sérums non absorbés. Agglutinations en tubes).

Sérums ABF		ANTIGÈNES CHAUFFÉS 2 H A 120 °C													
		N. mucosa										N. sicca			
		X 34	X 68	X 71	N 16	Man	Vin	Por	Fal	Pat	5 955	52 179	52 183	52 192	
Anti-mucosa	X 34	I 280	I 280	I 280	640	640	640			80	—	320	640	2 560	
	X 68	320	I 280	640	640	640	I 280		80	80	—	640	I 280	2 560	
	X 71	I 280	I 280	I 280	640		I 280		40	40	—	320	2 560	2 560	
	N 16	640	I 280	I 280	I 280	I 280	2 560	2 560	160	80	I 280	I 280	I 280	2 560	
	Pat	80	80	40	80	—	80	—	I 280	I 280	—	—	40	80	
	5 955				—				I 280	I 280				—	
Anti-sicca	52 179	640	640	I 280	640	320	I 280		80	80	—	640	640	I 280	
	52 183	I 280	I 280	I 280	640	320	640		160	160	320	I 280	I 280	I 280	
	52 192	640	I 280	640	I 280				160	160	640	640	I 280	I 280	

Seuls, sont figurés les résultats des épreuves qui ont été pratiqués.

Seuls, sont figurés les résultats des épreuves qui ont été pratiquées.

doivent posséder un antigène commun, et que 2 autres souches (Pat et 5 955) sont également apparentées.

La confirmation de cette hypothèse est apportée par les expériences de saturation croisée entre les souches, saturation des sérums ABF avec les bactéries chauffées deux heures à 120° C. Les résultats en sont reportés dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Agglutinations croisées au sein des deux sérotypes O 1 et O 2 de *N. mucosa* (Sérums absorbés. Agglutinations en tubes. Antigènes chauffés deux heures à 120° C).

SÉRUMS	SÉROTYPE O 1								SÉROTYPE O 2	
	X34	X68	X71	N16	Man	Vin	Por	Fal	Pat	5 955
N16 saturé par Pat	1 280	2 560	1 280	1 280	640	1 280	1 280	1 280	—	—
Pat saturé par N16	—	—	—	—	—	—	—	—	640	1 280

Il est donc possible de considérer que nos 10 souches se divisent en 2 sérotypes, les 8 premières souches étant du sérotype O 1 et les 2 dernières du sérotype O 2. Chaque sérotype est constitué d'un antigène commun à toutes les souches, auquel s'ajoutent des antigènes mineurs, variables d'une souche à l'autre, comme le montrent certaines expériences de saturations : par exemple, un sérum X71 saturé par X34 conserve un titre de 1/160 pour X71.

Néanmoins, l'abondance de l'antigène spécifique de type permet de réaliser un typage de toute nouvelle souche en utilisant le sérum ABF du type O 1 saturé par les bactéries chauffées du type O 2 et inversement, ces saturations s'effectuant très facilement, en une seule opération.

Les mêmes résultats sont obtenus par l'agglutination sur lames des suspensions bactériennes chauffées deux heures à 120° C, et lavées deux fois en tampon, alors que des suspensions chauffées seulement à 100° C, et non lavées, donnent de mauvais résultats en général.

4° RELATIONS ANTIGÉNIQUES DE « *N. MUCOSA* » AVEC LES AUTRES « *NEISSERIA* ». — *N. mucosa* est sans rapports antigéniques avec les souches que nous avons pu étudier de *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. catarrhalis*, *N. flavescens*, *N. flava* et *N. perflava*. Un certain nombre de suspensions bactériennes non chauffées ou chauffées de ces espèces ne sont pas stables et sont impropres aux épreuves d'agglutination.

Une souche de *N. caviae* (souche GP16 de Pelczar) [4] donne, avec les sérums anti-mucosa type O 1, des agglutinations très fortes de sa suspension formolée non chauffée (1/640 à 1/2 560) ; mais toutes les agglutinations sont négatives (au 1/20) avec la suspension chauffée deux heures à 120° C.

Les quatre souches étudiées de *N. sicca* donnent des réactions croisées importantes avec les sérums de *N. mucosa* type O 1. Deux de ces souches (52179, 52192) sont fortement agglutinées, non chauffées, par les sérums anti-sicca et par les sérums anti-mucosa type O 1 ; la souche 52183 n'est agglutinable vivante que par son propre sérum. Mais les relations croisées sont totales lorsqu'on utilise les sérums ABF et les souches chauffées de *N. mucosa* et *N. sicca* (Cf. tableau III).

Les expériences de saturations croisées entre *N. mucosa* type O 1 et *N. sicca*, reportées sur le tableau V, confirment l'existence d'un facteur antigénique principal, commun aux deux espèces, accompagné de facteurs accessoires spécifiques de certaines souches.

TABLEAU V. — Expériences de saturation croisée entre *N. mucosa* (sérotypage O 1) et *N. sicca* (Agglutinations sur lames).

SÉRUMS ABF SATURÉS		ANTIGÈNES CHAUFFÉS 2 H A 120°C					
Sérum anti-	Souche saturante	N. sicca				N. mucosa	
		52 179	52 183	52 192	5 956	N 16	Pat
N 16	Pat	320*	160	320	320	160	—**
N 16	52 179	—	20	40	—	20	—
N 16	52 183	160	—	320	320	160	—
52 179	Pat	160	40	320	160	160	—
52 179	N 16	—	—	20	—	—	—
52 179	52 183	80	—	80	80	40	—
52 183	Pat	80	80	160	40	80	—
52 183	N 16	—	40	—	—	—	—
52 183	52 179	—	40	—	—	—	—
Pat	N 16	—	—	—	—	—	160

(*) L'agglutination est positive jusqu'au 1/320.
 (**) L'agglutination est négative au 1/10.

Seize souches de *Neisseria* glucidolytiques isolées récemment par prélèvements de gorge, dans des rhino-pharyngites ou chez des sujets sains, ont été agglutinées en tubes (suspensions chauffées deux heures à 120° C) avec les sérums N 16 et Pat, saturés et non saturés : 10 souches agglutinent avec le sérum N 16 non saturé

à un taux égal ou supérieur à 1/320, 2 souches agglutinent au 1/320 avec le sérum Pat non saturé. Mais avec les sérums saturés, les résultats sont très nets :

6 souches sont agglutinées au 1/640 ou 1/1 280 avec le sérum N16 saturé par Pat et non agglutinées au 1/20 avec le sérum Pat saturé par N16 ;

10 souches ne sont pas agglutinées au 1/20 avec l'un ou l'autre des deux sérums saturés.

Enfin, en accord avec les travaux de Cary, Lindberg et Faber [5], qui n'avaient pas trouvé d'agglutinations croisées entre *M. polymorpha* (*B. anitratum*) et différentes espèces de *Neisseria*, nous n'avons trouvé, par la technique d'agglutination sur lames des germes vivants et des suspensions bactériennes chauffées à 100° C (quinze minutes et une heure), aucune agglutination de *Moraxella lwoffii* ou de *Moraxella glucidolytica* (*B. anitratum*) dans nos sérums de *N. mucosa*.

DISCUSSION.

La fréquence de l'aspect diplococcique de certaines espèces du genre *Moraxella* [6] ou de la tribu des *Mimeae* [7, 8] est une cause fréquente de confusion entre ces bactéries et les cocci du genre *Neisseria*, comme l'a signalé, le premier, Seeliger [9]. Dans certaines publications, mêmes récentes, les descriptions de bactéries appelées *D. mucosus* [10, 11] ou *Neisseria* [12] sont trop sommaires pour pouvoir classer valablement les germes décrits dans un genre ou dans un autre.

Les *Moraxella* du premier groupe [6], oxydase +, *M. lacunata* et *M. duplex*, auxquelles appartiennent sans doute les variétés oxydase + de *Mima polymorpha*, ne peuvent être confondues avec des *Neisseria*, car, à côté de formes courtes, coccobacillaires, elles présentent toujours des formes bacillaires, soit dans le produit pathologique, soit dans les cultures (surtout en bouillon). De plus, elles n'acidifient pas les glucides, contrairement à *N. mucosa*.

Dans les *Moraxella* du deuxième groupe, *M. lwoffii*, qui correspondrait à la variété oxydase — de *Mima polymorpha*, n'acidifie non plus aucun glucide ; seule, *M. glucidolytica*, qui correspondrait à certaines espèces des genres *Mima* et *Herellea*, pourrait être confondue avec des *Neisseria* glucidolytiques. Nous avons rappelé précédemment [4] les principaux caractères différentiels de *N. mucosa* et *M. glucidolytica*.

Le diagnostic de *N. mucosa* se fait donc sans ambiguïté. Contrairement à l'opinion de Seeliger [9], de Linzenmeier [13], de Klinge [14], ou de Simon [15], nous ne pensons donc pas qu'il faille faire rentrer toutes les bactéries décrites sous le nom de *D. mucosus* dans le genre *Moraxella*, *Mima* ou *Herellea*. En tout

état de cause, d'ailleurs, le nom de *Diplococcus* est à proscrire pour des bactéries pouvant présenter la forme de bâtonnets.

Le diagnostic différentiel entre ces bactéries est encore facilité par les épreuves sérologiques, car il n'existe pas de relations antigéniques croisées entre *M. glucidolytica* (ou *M. polymorpha* et *Herellea*) d'une part, et *N. mucosa* d'autre part, soit qu'on utilise des sérums anti-*Neisseria*, comme nous l'avons décrit plus haut, soit qu'on utilise des sérums anti-*Mima* ou anti-*Herellea*, comme l'ont fait Cary, Lindberg et Faber [5].

Une fois le germe classé dans le genre *Neisseria*, il faut encore en préciser l'espèce. Or, parmi les *Neisseria* aérobies dites saprophytes, le problème du diagnostic des espèces fermentaires et non hémolytiques a soulevé bien des controverses.

Actuellement, deux opinions sont en présence, bien présentées par Pelczar [16] : soit la classification telle qu'elle est décrite dans le *Bergey's Manual* [17], soit l'hypothèse de Wilson et Miles selon laquelle les *Neisseria* aérobies pigmentées sont toutes des variétés d'une même espèce [18].

La septième édition du *Bergey's Manual* [17] distingue, en effet : *N. sicca*, non chromogène, donnant des colonies sèches, acidifiant glucose, lévulose, maltose et saccharose ; et 3 espèces pigmentées en jaune verdâtre : *N. subflava* (lévulose —), *N. flava* (lévulose +, saccharose —), *N. perflava* (lévulose +, saccharose +).

Cette distinction classique repose, en fait, sur trois caractères : la pigmentation, la consistance des colonies, les fermentations glucidiques.

La caractérisation spectrophotométrique des pigments de *Neisseria* faite par Ellinghausen et Pelczar [19] semble montrer que les pigments des *Neisseria* sont très voisins et ne peuvent guère servir à distinguer des espèces. On sait, d'ailleurs, que cette pigmentation varie souvent selon les milieux et au cours des repiquages successifs. A titre indicatif, nous donnons la répartition

TABLEAU VI. — Répartition des souches de *Neisseria* saprophytes glucidolytiques selon leur pigmentation et leur appartenance ou non aux sérotypes O 1 et O 2 de *N. mucosa* :

PIGMENTATION	JAUNE FRANC	JAUNE PALE	BLANC
<i>N. mucosa</i> (sérotypes O 1 et O 2)	1	—	9
<i>N. sicca</i> (sérotipe O 1)	—	1	3
<i>N. sp.</i> (sérotipe O 1)	4	—	2
<i>N. sp.</i> (non typables avec O 1 et O 2)	5	3	1

des souches que nous avons étudiées en fonction de leur pigmentation (tableau VI).

D'après ce tableau, les sérotypes *mucosa* O 1 et O 2 semblent correspondre, le plus souvent, à des souches non pigmentées, et les sérotypes non typables (avec *mucosa* O 1 et O 2), à des souches pigmentées ; mais il y a de nombreuses exceptions. Signalons, à titre indicatif, que les deux souches provenant de la NCTC avaient, sur nos milieux, une pigmentation inverse de celle que laissait prévoir leur désignation, *N. flava* donnant des colonies blanches et *N. sicca* des colonies jaunes.

Nous avons indiqué [1] que les colonies de *N. mucosa* se présentaient, lors de leur prélèvement, sous trois formes principales : colonies sèches, « caoutchoutées », colonies intermédiaires, étirables, et colonies grasses, « en gâteau de semoule » ou, plus rarement, coulantes. Nous avons pu observer ces trois aspects alternativement, avec plusieurs souches, selon le milieu et la fréquence des repiquages. Il s'agit donc d'un caractère aléatoire, qui existe aussi d'ailleurs pour *N. sicca*, mais à un degré moindre. Cette grande variété de consistance semble dépendre uniquement de la nature de la substance interstitielle qui cimente les bactéries entre elles. Par contre, elle n'est pas liée directement à la présence d'une capsule qui se retrouve assez souvent dans les *Neisseria*, même dans les espèces afermentaires [20].

Mais le caractère le plus important, sur lequel la classification de ces *Neisseria* est basée, est, sans conteste, l'étude des fermentations sucrées [21]. L'influence du milieu de culture sur les résultats des fermentations est certainement très importante ; de toutes façons, l'étude des fermentations en milieux liquides [22] doit être proscrite, au profit des milieux gélosés [1], soit gélose inclinée ordinaire (1,5 p. 100 de gélose), soit gélose molle (0,4 p. 100 de gélose). Il semble cependant difficile de trouver un milieu de culture qui éviterait les résultats variables des répliques faites avec certaines souches, comme l'ont montré Hajek, Pelczar et Faber [23]. Il est toujours possible, semble-t-il, de trouver au sein d'une espèce qui semble homogène, des souches qui attaquent irrégulièrement certains glucides. Le maltose est pratiquement toujours fermenté et on trouve même des souches qui n'attaquent que lui [24]. Le glucose et le lévulose sont presque toujours fermentés. Le saccharose, par contre, est plus irrégulièrement touché, mais cela ne permet pas de distinguer des espèces. Enfin, le mannitol n'est jamais acidifié par les *Neisseria* et doit être proscrit des clés de détermination [23] ; on peut affirmer qu'une souche mannitol + [22] n'est pas une *Neisseria*.

En définitive, il semble qu'il faille envisager, chez les *Neisseria*, plus souvent l'existence de variétés que d'espèces [23] ; ceci est

vrai aussi pour les espèces afeementaires [20]. On en revient donc naturellement à l'hypothèse formulée, en 1955, par Wilson et Miles [18] selon laquelle, excepté *N. flavescens*, *N. catarrhalis* et « peut-être *N. pharyngis sicca* », les types restants des cocci Gram négatifs du nasopharynx normal doivent se combiner en une seule espèce qu'ils appellent *N. pharyngis*.

Warner, Faber et Pelczar [2] ont montré l'homogénéité sérologique de *N. pharyngis* (groupant *N. perflava*, *flava* et *subflava*) d'une part, et de *N. sicca* d'autre part, sans relations croisées entre ces deux espèces. Dans notre présent travail, nous avons montré qu'en utilisant les suspensions bactériennes chauffées *N. mucosa* et *N. sicca* étaient antigéniquement fortement apparentées, alors qu'elles sont sans liens antigéniques avec les autres espèces de *Neisseria*.

Nous sommes donc conduits à penser que *N. mucosa* (*D. mucosus* Lingelsheim) et *N. sicca* sont deux variétés d'une même espèce qui, semble-t-il, est assez fréquente [26]. Etant donné que la variation des colonies de *Neisseria* se fait aussi bien du type rugueux vers le type lisse ou muqueux qu'inversement [25], il est impossible et inutile de préciser lequel constitue le variant de l'autre considéré comme espèce-type. La séparation des deux variétés semble pouvoir être établie sans discussion par la propriété de réduire les nitrates jusqu'au stade azote pour *N. mucosa* et non pour *N. sicca*.

Deux sérotypes sont actuellement décrits, mais ce chiffre n'est évidemment pas limitatif.

RÉSUMÉ.

Nous avons montré qu'il est possible de révéler par chauffage (deux heures à 120° C) un antigène somatique majeur chez *N. mucosa* (*D. mucosus* Lingelsheim); cet antigène permet de diviser les 10 souches étudiées en deux sérotypes : O 1 (8 souches) et O 2 (2 souches). Les 4 souches étudiées de *N. sicca* possèdent, en plus d'antigènes mineurs, l'antigène O 1 de *N. mucosa*.

Il n'y a aucune réaction croisée entre ces antigènes et les suspensions chauffées de *Neisseria* appartenant aux autres espèces, notamment à *N. pharyngis* (*flava*); la différenciation de cette espèce d'avec *N. sicca* ou *N. mucosa* nous semble se baser plus sur des critères sérologiques que sur des caractères morphologiques ou cultureux.

La séparation de *N. mucosa* d'avec *Moraxella*, *Mima* ou *Herellea*, se fonde sans équivoque sur les caractères morphologiques cultureux et antigéniques de ces bactéries.

SUMMARY.

Neisseria mucosa (*Diplococcus mucosus* LINGELSHHEIM).

II. — ANTIGENIC STUDIES AND CLASSIFICATION.

By heating the suspensions (2 hours at 120° C) it is possible to demonstrate a major somatic antigen in *N. mucosa*. This antigen allows us to divide the 10 strains studied into two serotypes : O 1 (8 strains) and O 2 (2 strains). Beside minor antigens, the 4 *N. sicca* strains studied possess the O 1 *N. mucosa* antigen.

There is no cross-reaction between these antigens and heated suspensions of *Neisseria* belonging to the other species, especially to *N. pharyngis* (*flava*) ; the differentiation between these species and *N. sicca* or *N. mucosa* seems to rest on serological rather than on morphological or cultural characters.

The differentiation between *N. mucosa* and *Moraxella*, *Mima* or *Herellea*, is based without any doubt on morphological, cultural and antigenic characters.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VÉRON (M.), THIBAUT (P.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 497-510.
- [2] WARNER (G. S.), FABER (J. E. Jr) et PELCZAR (M. J. Jr). *J. inf. Dis.*, 1952, **90**, 97-103.
- [3] HABS (I.). *Z. Hyg.*, 1957, **144**, 218-228.
- [4] PELCZAR (M. J. Jr). *J. Bact.*, 1953, **65**, 744.
- [5] CARY (S. G.), LINDBERG (R. B.) et FABER (J. E. Jr). *J. Bact.*, 1958, **75**, 43-45.
- [6] PIÉCHAUD (D.), PIÉCHAUD (M.) et SECOND (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 517-522.
- [7] OLAFSSON (M.), LEE (Y. C.) et ABERNETHY (T. J.). *New Engl. J. Med.*, 1958, **258**, 465-470.
- [8] WAITE (C. L.) et KLINE (A. H.). *Amer. J. Dis. Child.*, 1959, **98**, 379-384.
- [9] SEELIGER (H.). *Zbl. Bakt., I Orig.*, 1953, **159**, 173-176.
- [10] SUNG-KAO (C.) et WEN-CHIEH (C.). *Chin. med. J.*, 1957, **75**, 764-769.
- [11] MUSETEANU (C.), ZAMBILOVICI (Z), TIMERMAN (I.) et BARNEA (I.). *Arch. fr. Pédiatr.*, 1959, **16**, 369-370.
- [12] COLLOMB (H.), MERLIHOT (J. E.) et BRYGOO (E.). *Méd. trop.*, 1953, **13**, 347.
- [13] LINZENMEIER (G.). *Zbl. Bakt., I. Orig.*, 1955, **163**, 348-352.
- [14] KLINGE (K.). *Arch. Hyg.*, 1958, **142**, 171-179.
- [15] SIMON (C.). *Ann. Paediat.*, 1959, **192**, 46-52.
- [16] Interim report of the subcommittee on the family *Neisseriaceae*. *Int. Bull. Bact. Nomen. Taxon.*, 1954, **4**, 102-105.

- [17] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 7^e édit., Williams and Wilkins C^o, Baltimore, 1957, 480-485.
 - [18] WILSON (G. S.) et MILES (A. A.). *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, 4^e édit., Arnold, Londres, 1955, 1, 627.
 - [19] ELLINGHAUSEN (H. C. Jr) et PELCZAR (M. J. Jr). *J. Bact.*, 1955, 70, 448-453.
 - [20] COURTOIS (G.), THYS (A.) et VERSELDER (R.). *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1954, 34, 13-20.
 - [21] ROIRON (V.). *Rev. Pratic.*, 1957, 7, 2513-2516.
 - [22] BISHOP (L. K.) et RANDALL (C. C.). *Amer. J. Dis. Child.*, 1947, 74, 725.
 - [23] HAJEK (J. P.), PELCZAR (M. J. Jr) et FABER (J. E. Jr). *Amer. J. Clin. Path.*, 1950, 20, 630-636.
 - [24] PELCZAR (M. J. Jr) et DOETSCH (R. N.). *Science*, 1949, 110, 256.
 - [25] WILSON (G. S.) et SMITH (M. M.). *J. Path. Bact.*, 1928, 31, 597.
 - [26] SAVINI (R.). *Nuovi Ann. Ig. Microb.*, 1957, 8, 651-655.
-

SUR LA RÉACTIVATION D'ESCHERICHIA COLI APRÈS TRAITEMENT PAR LES RAYONS ULTRAVIOLETS

II. — PHOTORÉACTIVATION DES SUSPENSIONS AQUEUSES DE BACTÉRIES IRRADIÉES

par R. LINZ et E. LECOCQ (*).

*(Laboratoire de Bactériologie de l'Université libre de Bruxelles
et Laboratoire de Biologie Clinique
de l'Hôpital Universitaire Saint-Pierre, Bruxelles.)*

Dans des notes antérieures [6, 7, 9], nous avons examiné certains aspects de la réactivation d'*E. coli* irradié par les ultraviolets, puis mélangé à du bouillon et conservé à 37°. Dans le présent mémoire, nous nous proposons d'étudier la photoréactivation (Kelner [5]) de ces bactéries irradiées en suspension aqueuse.

TECHNIQUES.

Les techniques sont les mêmes que précédemment [9]. Nous avons utilisé cependant certains variants supplémentaires d'*E. coli*, souches B et K12. Ces variants sont résistants : à 500 µg de streptomycine par millilitre ; ou aux phages T4 ou T6 ; ou à la streptomycine et à un de ces phages à la fois ; ou à la tétracycline (500 µg/ml) et à un des phages à la fois.

Les bactéries sont mises en suspension dans la solution physiologique stérile (NaCl 0,9 p. 100). Après irradiation par les ultraviolets, on transvase les suspensions dans des tubes (diamètre : 17 mm), qu'on place verticalement à 2 cm d'une lampe à fluorescence blanche (lampe horizontale) [8]. Le niveau des liquides déborde la lampe de 3 cm au maximum vers le haut ou vers le bas. Après deux à vingt-quatre heures d'illumination, la température des tubes dépasse celle de la chambre (20° C) de 2 à 3 degrés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

EXPÉRIENCE 1. — Une suspension d'*E. coli* B est divisée en plusieurs portions ; l'une, témoin, n'est pas irradiée, les autres sont traitées par les ultra-violets pendant une, trois ou neuf

(*) Manuscrit reçu le 29 septembre 1960.

minutes. Tout de suite après l'irradiation (temps zéro) et après une exposition à la lumière de deux et de quatre heures, on fait des numérations des bactéries viables (tableau I).

TABLEAU I. — Photoréactivation d'*E. coli* B après traitement par les ultra-violets pendant des temps variables.

DURÉE DU TRAITEMENT U.V.	NUMÉRATIONS (PAR ML)				
	Temps zéro	Après 2 h lumière		Après 24 h lumière	
	Nombre de colonies	Nombre de colonies	R	Nombre de colonies	R
0 (témoin)	361×10^7 (4,0)	353×10^7 (3,0)	1	389×10^7 (2,8)	1
1 mn	746×10^4 (4,1)	435×10^4 (4,4)	57	510×10^4 (2,0)	68
3 mn	480 (7,0)	475×10^3 (1,7)	990	$1\ 888 \times 10^4$ (2,6)	39 000
9 mn	71 (19)	422 (6,8)	6	7 140 (2,9)	100

La concentration de celles-ci dans la suspension témoin ne varie pratiquement pas pendant le temps d'observation. Mais les suspensions irradiées présentent une multiplication apparente rapide : c'est la réactivation. Si on appelle facteur de réactivation R le facteur de multiplication apparente depuis le moment zéro, on voit qu'il augmente avec le temps d'exposition à la lumière. Il est beaucoup plus élevé lorsque l'irradiation par les ultra-violets a duré 3 minutes que lorsqu'elle a duré une ou neuf minutes.

Des résultats semblables ont été obtenus dans toutes les expériences portant sur *E. coli* B et K12.

Dans une expérience où des numérations plus fréquentes ont été faites dans la suspension d'*E. coli* B irradiée pendant trois minutes, puis soumise à la lumière blanche, les facteurs de réactivation suivants ont été observés : après une heure de lumière, 40 ; après deux heures, 320 ; après quatre heures, 2 640 ; après six heures, 3 050 ; après vingt et vingt-quatre heures, 6 000.

Dans certaines expériences, ils peuvent atteindre 10 000 à 100 000 après vingt-quatre heures de lumière.

EXPÉRIENCE 2. — Observe-t-on encore une photoréactivation dans les suspensions irradiées d'*E. coli*, lorsqu'on empêche les bactéries de se rencontrer en solidifiant le milieu dans lequel elles sont immergées ?

On songe à ajouter de la gélatine au milieu, mais celle-ci convient mal à l'expérience. Elle se solidifie trop lentement à froid et se liquéfie trop facilement à la température du laboratoire.

Nous avons préféré la congélation brusque par le froid (-80°C), et l'exposition à la lumière dans une glacière. Aussitôt après l'irradiation, les tubes contenant la suspension d'*E. coli* irradiée et la suspension témoin, non irradiée, sont plongés dans un vase de Dewar contenant un mélange d'acétone et de neige carbonique à -80°C . La congélation est instantanée. Les deux tubes sont portés dans une glacière à -12°C où est aussi introduite la lampe à lumière blanche. La température des tubes reste voisine de -8°C .

Des numérations faites après la congélation et vingt-quatre heures de lumière à -8°C montrent que la photoréactivation est nulle ou extrêmement faible dans ces conditions; le nombre des germes viables dans la suspension témoin reste à peu près invariable (tableau II). Les colibacilles traités par les ultra-violets n'ont cependant pas perdu la propriété d'être réactivables par la lumière: si on sort les tubes congelés de la glacière, si on les dégèle et si on les soumet une nouvelle fois à la lumière, mais à la température de la chambre ($+22^{\circ}$), la réactivation se fait normalement; le nombre de cellules capables de former des colonies devient semblable à celui des suspensions irradiées et sou-

TABLEAU II. — Influence de la congélation sur la photoréactivation d'*E. coli* traité par les ultra-violets pendant trois minutes.

E. COLI	TEMPS ZÉRO	NUMÉRATIONS					
		Après 24 h de lumière à $+24^{\circ}\text{C}$		Après 24 h de lumière à -8°C		Après 24 h de lumière à -8°C et 24 h de lumière à $+24^{\circ}\text{C}$	
		Nombre de colonies	R	Nombre de colonies	R	Nombre de colonies	R
Souche B : témoin	255×10^7 (3,9)	285×10^7 (2,3)	I	246×10^7 (4,1)	I	205×10^7 (4,5)	0,8
U.V.	922 (1,1)	831×10^5 (3,1)	9×10^4	2035 (2,3)	2	511×10^5 (2,9)	6×10^4
Souche K12 : témoin	260×10^7 (1,2)	291×10^7 (1,4)	I	282×10^7 (0,9)	I	212×10^7 (1,7)	0,8
U.V.	1829 (0,9)	109×10^6 (5,2)	6×10^4	253 (0,6)	0,14	981×10^5 (6,8)	5×10^4

mises de suite à la lumière, à la température de la chambre, sans congélation intermédiaire.

La photoréactivation est donc supprimée par la congélation, mais a lieu aussitôt que le milieu est fondu.

On pourrait croire que c'est le froid qui inhibe la réactivation. Cela est très peu probable. En effet, dans un essai témoin, une portion de la suspension d'*E. coli* B irradiée de l'expérience précédente est exposée à la lumière dans une glacière où la température, au niveau du tube, est de + 4° C. Après vingt-quatre heures, la suspension contient, par ml, 953×10^4 cellules viables ($V = 2,8$); le facteur de réactivation R est donc de 1×10^4 , au lieu de 9×10^4 , chiffre obtenu lorsque la suspension est soumise à la lumière à + 23° C. Il est douteux qu'un abaissement supplémentaire de la température à — 8° C puisse faire tomber le facteur R à 2 ou à 0,14 après vingt-quatre heures, si le milieu ne se solidifiait pas en même temps.

On peut donc admettre que l'inhibition de la photoréactivation est provoquée par la solidification elle-même.

EXPÉRIENCE 3. — La photoréactivation des colibacilles irradiés est-elle due à la rencontre et à l'union de cellules lésées, mais non tuées? Si pareille union était réalisée, la colonie formée devrait hériter des propriétés de tous ses parents.

Aussi avons-nous mélangé des variants différents et marqués d'une même souche; par exemple, des variants résistants à la streptomycine (rS), à la tétracycline (rT), aux bactériophages T4 (r4) ou T6 (r6), ou à un antibiotique et à un bactériophage (rSr6, rTr4). La souche B d'*E. coli* ne convient pas à cet essai, à cause de son comportement spécial sur gélose à la tétracycline [9]. On emploie donc la souche K12. Celle-ci fournit beaucoup plus de colonies résistantes sur gélose contenant 2,5 µg de tétracycline par ml que la souche B (environ 1 colonie pour 10^4 cellulesensemencées). Mais elle n'en donne qu'une pour 10^6 cellules si la gélose en contient 5 µg/ml. Aussi utilise-t-on cette concentration.

On mélange des suspensions des variants marqués d'*E. coli* K12, de telle sorte que le mélange soit également riche, à peu près, en cellules viables des deux variants. Ce mélange est irradié pendant trois minutes, puis exposé vingt à vingt-quatre heures à la lumière blanche, à la température du laboratoire. Avant et après cette exposition, on pratique des numérations des cellules viables sur gélose ordinaire et sur gélose additionnée de streptomycine (200 µg/ml), de tétracycline (5 µg/ml) ou de ces deux antibiotiques à la fois (par ml S 200 µg + T 5 µg). On ajoute les témoins nécessaires.

Sur gélose contenant les deux antibiotiques à la fois, la taille des colonies est très petite. Aussi leur dénombrement est-il retardé jusqu'au cinquième jour d'incubation à 37°.

Pour connaître la sensibilité aux phages des colonies obtenues sur les divers milieux, on émulsionne celles-ci dans assez de bouillon pour que le trouble soit juste perceptible ; 1 goutte de cette suspension (environ 10^5 germes) est ensemencée dans 5 ml de bouillon contenant les phages à la dilution 10^{-4} (les phages provoquent la lyse à la dilution 10^{-8}). Quatre tubes sont utilisés pour chaque colonie : le premier contient le phage

TABEAU III. — Photoréactivation de mélanges de variants d'*E. coli* K12.

SUSPENSIONS	U.V.	LUM. BL.	NOMBRE DE COLONIES PAR ML			
			Gélose 0	Gélose S 200	Gélose T 5	Gélose S 200 T 5
K12rSr6	0	0	401×10^7 (2,0)	355×10^7 (0,8)	162×10^1 (10,2)	230 (25,1)
	0	22 h	360×10^7 (3,1)	329×10^7 (2,8)	141×10^1 (9,8)	621 (21,2)
	3 mn	0	1 391 (6,1)	920 (1,4)	25 (20,9)	1 (—)
	3 mn	22 h	593×10^3 (4,3)	497×10^3 (4,0)	28 (35,7)	0 (—)
K12rTr4	0	0	152×10^7 (2,5)	0 (—)	266×10^6 (8,0)	0 (—)
	0	22 h	109×10^7 (2,1)	0 (—)	238×10^6 (8,8)	0 (—)
	3 mn	0	365×10^3 (4,0)	0 (—)	710×10^3 (5,1)	0 (—)
	3 mn	22 h	363×10^3 (2,3)	0 (—)	740×10^3 (4,9)	0 (—)
Mélange K12rSr6 + K12rTr4	0	0	232×10^7 (3,0)	941×10^6 (2,2)	206×10^6 (3,2)	29 (31,2)
	0	22 h	108×10^7 (2,5)	448×10^6 (2,1)	94×10^6 (5,3)	63 (29,3)
	3 mn	0	2 449 (1,9)	701 (3,4)	369 (6,2)	0 (—)
	3 mn	22 h	369×10^3 (2,2)	235×10^3 (2,7)	44×10^3 (8,8)	477×10^1 (22,9)

T4 ; le deuxième, le phage T6 ; le troisième, un mélange des phages T4 et T6 ; le quatrième, témoin, ne contient pas de phage.

Les résultats d'une expérience typique sont exposés ci-dessous ; elle porte sur les variants K12rSr6 et K12rTr4 (tableau III).

La suspension de K12rSr6 forme presque autant de colonies sur gélose S200 que sur gélose 0. Elle en forme quelques unes également sur gélose T5 : environ 1 pour 2×10^6 cellules ensemencées. Elle en forme même quelques unes sur gélose contenant les deux antibiotiques (S200 T5) : 1 pour 2×10^7 cellules. Remarquons que la dispersion, autour de la moyenne, du nombre des colonies sur gélose T5 et gélose S200 T5 est grande, comme en témoignent les coefficients élevés de variation. L'exposition à la lumière blanche de la suspension irradiée produit une réactivation classique.

Dans la suspension de K12rTr4, un quart ou un cinquième seulement des cellules sont capables de se développer sur gélose additionnée de 5 μ g de tétracycline par ml (presque toutes les cellules sont capables de se développer sur gélose additionnée de 2,5 μ g/ml). Aucune colonie ne se développe sur gélose additionnée, par ml, de 200 μ g de streptomycine seule ou mélangée avec 5 μ g de tétracycline, même si on ensemence 10^9 cellules. L'irradiation et l'exposition à la lumière produisent la réactivation classique, mais ne modifient pas le comportement du variant sur ces milieux de culture.

Mélangons 1 volume de la suspension de K12rSr6 (plus riche en bactéries), avec 3 volumes de la suspension K12rTr4 (moins riche). Ce mélange fournit les nombres de colonies prévus sur gélose 0, gélose S200, gélose T5 et gélose S200 T5. Les chiffres sont à peine modifiés par la mortalité normale quand le mélange a séjourné vingt-deux heures devant la source de lumière blanche. Lorsqu'on traite le mélange par des ultra-violets (trois minutes), le nombre des cellules capables de former des colonies sur gélose 0 est fortement réduit et le nombre des colonies sur les milieux avec antibiotiques reste dans les proportions connues.

Mais si on expose à la lumière blanche le mélange traité par les ultrats-violets, la photoréactivation se manifeste et, en même temps, la proportion des colonies qui se développent sur gélose S200T5, croît (tableau III).

En effet, les proportions pour les mélanges considérés sont les suivantes (approximativement) :

Mélange non irradié :

temps zéro	1×10^{-8}
après vingt-deux heures lumière blanche	6×10^{-8}

Mélange U.-V. :

temps zéro	zéro ou $< 4 \times 10^{-4}$
après vingt-deux heures lumière blanche	1×10^{-2}

Après ultra-violet et photoréactivation, la proportion des colonies développées sur gélose S200T5 est donc 10^6 fois plus grande qu'avant tout traitement.

Ici encore, la dispersion autour de la moyenne du nombre des colonies développées dans les divers flacons de gélose S200T5 est très grande lorsqu'il s'agit du mélange irradié et soumis à la lumière blanche ; dans l'exemple choisi, le coefficient de variation est de 22,9 p. 100. La dispersion est faible pour la gélose sans antibiotiques, et intermédiaire pour la gélose contenant uniquement la tétracycline (5 $\mu\text{g/ml}$).

Néanmoins, la proportion des colonies développées sur la gélose contenant à la fois la streptomycine et la tétracycline est devenue un million de fois plus grande après irradiation et photoréactivation du mélange des variants K12rSr6 et K12rTr4. On est tenté de supposer que les deux variants se sont réellement combinés au conjugués. D'un autre côté, les conclusions tirées du marquage de ces variants par la résistance aux bactériophages, ne sont pas en faveur de pareille hypothèse.

En effet, s'il y avait eu conjugaison, les colonies développées sur gélose S200T5 devraient être résistantes également aux deux phages T4 et T6. Or, 50 colonies prélevées sur cette gélose ont toutes présenté les mêmes caractères que le variant K12rSr6 : elles étaient résistantes au phage T6 et sensibles à T4 ; aucune n'était résistante à T4 comme le variant K12rTr4.

Rapprochons de cette constatation que toutes les colonies fournies par K12rSr6, même les rares colonies spontanément formées sur gélose T5 ou S200T5, sont sensibles au phage T4 et résistantes à T6.

Tout se passe donc comme si les colonies du mélange irradié et soumis à la lumière blanche provenaient uniquement des cellules de K12rSr6.

EXPÉRIENCE 4. — Une modification de l'expérience précédente a été réalisée en traitant séparément par les ultra-violets des suspensions pures de K12rSr6 et de K12rTr4, en les mélangeant aussitôt après et en soumettant le mélange à la lumière blanche.

Les résultats ont été semblables à ceux de l'expérience 3.

Les variants K12rSr4 et K12rTr6 n'ont pas été utilisés parce que leurs cultures sont trop pauvres et trop sensibles aux ultra-violets.

DISCUSSION.

La photoréactivation de suspensions aqueuses d'*E. coli*, souches B ou K12, traitées par les ultra-violets, est maximum lorsque l'irradiation dure trois minutes : les coefficients de réactivation sont plus petits pour des irradiations d'une ou de neuf minutes. La réactivation augmente avec le temps d'exposition à la lumière, sauf si la suspension est trop diluée (Linz, [8]).

La réactivation des bactéries irradiées ne semble s'effectuer

qu'en milieu liquide : dans l'eau salée, devant une source lumineuse, ou dans le bouillon nutritif à l'obscurité [9]. Delaporte [2] et Gillies et Alper [1 et 4] l'ont obtenue à la surface de milieux gélosés. Mais on sait que, si on incorpore à la gélose nutritive une suspension aqueuse irradiée, elle ne donne qu'autant de colonies qu'elle contient de germes « viables » à ce moment : la réactivation de nombreuses cellules qui se poursuit pendant ce temps dans le milieu liquide ne se manifeste pas dans la gélose (où le nombre des colonies n'augmente pas). La solidification du milieu empêche donc la réactivation.

On peut se demander si des bacilles de la suspension irradiée, qui n'ont pas été tués, ne seraient pas lésés et devenus inaptes à donner naissance à une colonie visible, et si, à la faveur de rencontres au sein du véhicule liquide (mouvement brownien, brassage etc...) deux ou plusieurs de ces bacilles lésés, accolés ou conjugués, ne seraient pas capables d'édifier ensemble la colonie qu'ils ne peuvent édifier seuls. Pareille hypothèse expliquerait l'absence de réactivation en milieu gélosé.

L'expérience 2 semble plaider en ce sens : lorsqu'on congèle une suspension irradiée d'*E. coli* et qu'on l'expose à la lumière à la température de -8°C , la photoréactivation est inhibée totalement ou presque totalement ; lorsque le milieu est fondu, la propriété des bacilles d'être réactivables reparait. D'autre part, l'abaissement de la température ne suffit probablement pas, à elle seule, pour annuler presque complètement la photoréactivation.

Delaporte [2] a montré que, si les bactéries sont traitées par les ultra-violets à la surface d'un milieu gélosé, puis portées à 37° , les cellules isolées ne s'allongent généralement pas ; au contraire, toutes celles qui étaient réunies en amas s'allongent. Elle conclut que les bactéries irradiées se restaurent l'une l'autre. Cependant, au cours d'expériences analogues, Galperin et Errera [3] n'ont pas observé la formation de colonies par des bactéries irradiées et réunies en amas.

Nous-mêmes n'avons pas réussi à prouver le bien-fondé de notre hypothèse d'accolement et de conjugaison. En effet, si l'hypothèse était vraie, les colonies issues de plusieurs bacilles qui se « réactiveraient » l'un l'autre devraient posséder à la fois toutes les propriétés héréditaires de leurs parents. Nous avons mélangé les variants K12rSr6 et K12rTr4 et irradié le mélange. Tout de suite et après exposition à la lumière, nous avonsensemencé des parties aliquotes sur gélose O, S, T ou ST. Après irradiation et photoréactivation, la proportion de germes capables de former des colonies sur gélose ST a considérablement augmenté (un million de fois dans l'expérience 3), comme si beaucoup de colonies avaient hérité de chacun des deux variants leur résistance

aux antibiotiques. Mais le double marquage permet de voir que les cellules de ces colonies ne sont pas résistantes aux deux bactériophages, T4 et T6 : elles le sont seulement à T6, comme le variant K12rSr6. C'est précisément de ce variant qu'on peut obtenir facilement une certaine proportion de colonies sur la gélose ST, proportion faible, à vrai dire.

Notre démonstration a donc échoué. Néanmoins, on est frappé par la forte augmentation (un million de fois) de la proportion des colonies développées sur gélose ST après irradiation et photoréactivation, soit d'un mélange K12rS + K12rT, soit d'un mélange K12rSr6 + K12rTr4. Cette augmentation n'existe pas si on irradie K12rS ou K12rSr6 sans les mélanger avec des variants résistants à la tétracycline.

Si une conjugaison avait eu lieu entre K12rSr6 et K12rTr4, le caractère résistant au phage T6 serait-il dominant et le caractère résistant au phage T4, récessif ? C'est une possibilité, mais nous n'en avons aucune preuve.

CONCLUSIONS.

1° Si on solidifie par congélation une suspension irradiée d'*E. coli*, on empêche la photoréactivation de se manifester, comme si celle-ci dépendait des possibilités de rencontre des bacilles dans le milieu liquide.

2° Si on mélange des variants d'*E. coli* K12 résistants à des antibiotiques différents (streptomycine et tétracycline) et à des bactériophages différents (T4 et T6), si on traite ce mélange par les ultra-violets, et si on le soumet ensuite à la lumière blanche, on voit apparaître une forte proportion de bacilles résistants aux deux antibiotiques à la fois, mais ces bacilles ne sont résistants qu'au seul phage T6.

3° La preuve n'est donc pas faite que la réactivation soit due à l'union ou la conjugaison des colibacilles irradiés.

SUMMARY.

REACTIVATION OF *Escherichia coli* AFTER TREATMENT BY U. V. RAYS.

II. — PHOTOREACTIVATION OF AQUEOUS SUSPENSIONS OF IRRADIATED BACTERIA.

1. In a suspension of irradiated *E. coli* solidified by freezing, reactivation does not take place : this reactivation seems therefore to depend upon the possibilities of encounter of the bacilli in a liquid medium.

2. If variants of *E. coli* K12 resistant to different antibiotics (streptomycin and tetracyclin) and to different phages (T4 and T6)

are mixed, and if this mixture is treated first by ultraviolet rays, then by white light, a high percentage of bacilli resistant to both antibiotics appear, but these bacilli are resistant to T6 only.

3. There is therefore no evidence of reactivation being due to conjugation or recombination of the irradiated bacilli.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALPER (T.) et GILLIES (N. E.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 461-472.
- [2] DELAPORTE (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1873 et 1453.
- [3] GALPERIN (H.) et ERRERA (M.). *Protoplasma*, 1956, **46**, 210-212.
- [4] GILLIES (N. E.) et ALPER (T.). *Nature*, 1959, **183**, 237-238.
- [5] KELNER (A.). *J. Bact.*, 1949, **58**, 511-522.
- [6] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1958, **152**, 1599-1601.
- [7] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **153**, 373-376.
- [8] LINZ (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **153**, 1076-1079.
- [9] LINZ (R.) et LECOCQ (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 743-756.

SÉRODIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS

ÉTUDE COMPARATIVE DES RÉACTIONS "CLASSIQUES" ET DE LA FIXATION DU COMPLÉMENT AVEC L'ANTIGÈNE PROTÉIQUE DU TRÉPONÈME REITER

par Th. M. VOGELSANG, J. PILLOT et M. FAURE (*).

(Institut Gade, Bergen, et Institut Pasteur, Paris)

Gaechtgens [1] a été le premier à utiliser la souche de tréponème Reiter non pathogène comme antigène dans la réaction de fixation du complément pour le sérodiagnostic de la syphilis. On a donné le nom de Palligen aux suspensions aqueuses phénolées de tréponèmes Reiter et on a dénommé Pallida-réaction la réaction de fixation du complément employant le Palligen comme antigène. D'après Gaechtgens [2, 3], la Pallida-réaction et la réaction de Bordet-Wassermann doivent être considérées comme des tests biologiquement différents ; alors que dans la réaction de Bordet-Wassermann, on a une réaction lipide-antilipide dans laquelle une substance sérique, la réagine, réagit avec le lipide ubiquitaire des tissus, dans la Pallida-réaction interviennent comme antigènes, en plus des lipides tréponémiques, surtout des protéines tréponémiques.

On a confirmé l'intérêt de la Pallida-réaction dans le sérodiagnostic de la syphilis tant avec les sérums sanguins [4, 5, 6] qu'avec les liquides céphalo-rachidiens [7, 8], car elle possède une sensibilité satisfaisante et une bonne spécificité. On a également utilisé ce test pour distinguer les réactions biologiques faussement positives des réactions syphilitiques spécifiques [9] : l'absorption des sérums non syphilitiques avec les extraits tissulaires rend la Pallida-réaction négative, alors que cette réaction demeure positive avec les sérums syphilitiques absorbés.

D'Alessandro et ses collaborateurs [10-12] ont démontré que la souche Reiter contient différents antigènes. Ils ont isolé une fraction protéique qu'ils considèrent comme un antigène commun à *Treponema pallidum* pathogène et au tréponème Reiter saprophyte.

(*) Manuscrit reçu le 26 septembre 1960.

La présence d'anticorps vis-à-vis de cet antigène de nature protéique spécifique des tréponèmes a été nettement établie dans un pourcentage élevé de sérums de sujets syphilitiques. Les observations relatives à l'emploi de cet extrait protéique soluble thermolabile du tréponème Reiter dans la fixation du complément ont révélé une sensibilité satisfaisante et une spécificité très élevée [13-17].

Pillot et Faure [18, 19] ont montré que les préparations de l'antigène protéique du tréponème Reiter sont loin d'être constituées par des produits purs, tant du point de vue chimique que du point de vue immunologique. Ils ont décrit une méthode permettant de préparer avec un bon rendement l'antigène de groupe du tréponème Reiter. La préparation purifiée de cet antigène de groupe contient plusieurs constituants antigéniques qu'ils ont mis en évidence par précipitation en milieu gélifié.

Ce travail a pour objet l'étude comparative des réactions « classiques » mettant en jeu l'antigène lipidique de Wassermann et de la réaction de fixation du complément avec deux types de préparations protéiques Reiter, étude pratiquée avec un matériel sérique sélectionné.

MATÉRIEL.

Les sérums sont sélectionnés à partir du matériel de routine envoyé au laboratoire de sérologie de l'Institut Gade, Bergen, pour exécution des tests sérologiques de la syphilis. On a essayé de trouver des sérums correspondant aux divers stades de la syphilis, spécialement à la syphilis latente et à des cas traités. En outre, nous avons choisi pour cette étude les sérums qui avaient donné des résultats discordants avec les tests dits « classiques » de la routine, en l'absence de toute indication de syphilis. Parmi ces sérums, il y a probablement quelques sujets donnant des réactions biologiques faussement positives et également quelques malades atteints de syphilis non diagnostiquée.

Le matériel est constitué par 677 sérums provenant de malades atteints d'affection syphilitique reconnue et 401 sérums de malades ne présentant aucune évidence de syphilis clinique ou anamnétique.

MÉTHODES.

Les tests sérologiques suivants ont été pratiqués dans ces examens.

B.-W. (réaction de Bordet-Wassermann). — La méthode employée pour ce test est une modification de la technique de Eagle [20] avec une longue fixation à $+2 + 4^{\circ}$, suivie d'une incubation dans un bain-marie à 37° pendant trente minutes. Une description détaillée de l'exécution de ce test a été donnée dans une publication antérieure [8]. L'antigène brut a été remplacé par un antigène cardiolipidique, mais le reste du procédé est exactement le même.

L'antigène cardiolipidique possède la composition suivante : cardiolipide, 0,0175 p. 100 ; lécithine d'œuf, 0,0875 p. 100 ; cholestérol,

0,3 p. 100. Dans cette réaction, cet antigène est utilisé à la dilution de 1/30.

Meinicke. — Une description détaillée de l'exécution de la réaction de clarification de Meinicke est donnée dans la même communication antérieure [8].

V. D. R. L. — La méthode employée pour réaliser le test de floculation en tube du V. D. R. L. (Venereal Disease Research Laboratory) a été Pour économiser les sérums, nous avons réduit les quantités de sérum décrite complètement en détail par Harris, Rosenberg et del Vecchio [24]. et d'antigène de 0,5 à 0,2 ml [22].

F. C. P. R. (Réaction de Fixation du Complément avec la Protéine Reiter). — On a utilisé la technique de Kolmer avec doses réduites à 1/5 [23] sans autre modification que le remplacement de l'antigène de Kolmer par les deux antigènes protéiques Reiter : n° 27 et n° 29. La dilution optimum des antigènes employés est 1/80.

L'antigène n° 27 est constitué par des tréponèmes lavés avec une solution physiologique tamponnée à pH 7,2, puis broyés par action des ultrasons à pH 8 ; nous avons dénommé ce type de préparation non purifiée « antigène tréponémique » [49].

L'antigène n° 29 est un « extrait protéique » purifié, préparé à partir du même lot de tréponèmes que l'antigène n° 27 et à l'aide de la technique décrite en détail dans [48]. Les tréponèmes lavés à pH 7,2 sont délipidés avec du butanol et de l'éther, broyés par action des ultrasons à pH 9 ; les protéines solubilisées sont purifiées par précipitation à pH 3,5, puis redissoutes dans l'eau à pH 8.

Les résultats obtenus avec les réactions de fixation du complément sont exprimés par les symboles N, F, R dont la signification est donnée dans le tableau I.

TABLEAU I. — Notation des résultats.

DEGRÉ DE RÉACTIVITÉ	BW	FCPR
Non réactif (N)	Hémolyse totale	Hémolyse totale
Réactif faible (F)	±. +	±, 1 +, 2 +
Réactif (R)	++	3 +, 4 +

RÉSULTATS.

Le tableau II montre les sensibilités et spécificités relatives des divers tests. Dans les sérums provenant de malades chez lesquels on a diagnostiqué une syphilis, c'est le V. D. R. L. qui a donné le pourcentage le plus élevé de réactivité et le B.-W. le pourcentage le plus bas. Alors que 9,3 p. 100 seulement des sérums ne réagissent absolument pas avec le V. D. R. L., 12,1 p. 100 sont négatifs avec « l'antigène tréponémique » n° 27 et 13,4 p. 100 avec l'« extrait protéique » n° 29.

Des 401 sérums de sujets présumés non syphilitiques utilisés pour déterminer les spécificités relatives des tests, 75,8 p. 100 sont dénués d'activité avec l'antigène Reiter n° 27 et 77,3 p. 100 avec l'antigène Reiter n° 29, alors que 54,9 p. 100 seulement sont négatifs avec le V. D. R. L.

TABLEAU II. — Degrés de réactivité.

SYPHILIS PRÉSENTE											
Degré de réactivité	BW		Meinicke		VDRL		N° 27		N° 29		
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
R	433	63.9	524	77.4	586	86.6	531	78.4	515	76.1	
F	83	12.3	45	6.4	28	4.1	64	9.5	71	10.5	
N	161	23.8	108	16.6	63	9.3	82	12.1	91	13.4	
SYPHILIS PRÉSUMÉE ABSENTE											
R	87	21.7	168	41.9	170	42.4	68	17.6	60	15.6	
F	34	8.5	29	7.2	11	2.7	29	7.2	31	7.7	
N	280	69.8	204	50.9	220	54.9	304	75.8	310	77.3	

R, réactif ; F, réactif faible ; N, non réactif. BW, réaction de Bordet-Wasserman ; Meinicke, réaction de clarification de Meinicke ; V. D. R. L., réaction du Venereal Disease Research Laboratory ; n° 27, « Antigène tréponémique » Reiter, lot n° 27 ; n° 29, « Extrait protéique » Reiter, lot n° 29.

Le tableau III expose les résultats concordants et discordants obtenus avec ce matériel. Des 677 sérums syphilitiques, 80 à 90 p. 100 donnent des résultats concordants entre les tests « classiques » de la routine et la F. C. P. R., alors que les deux antigènes Reiter utilisés dans la F. C. P. R. présentent entre eux une concordance de 98,7 p. 100. Avec les sérums non syphilitiques, les résultats discordants entre les tests « classiques » et la F. C. P. R. sont en nombre plus élevé, jusqu'à 31,9 p. 100 entre le Meinicke et la F. C. P. R., alors que les deux antigènes Reiter présentent entre eux une concordance de 97,5 p. 100.

Le tableau IV montre les résultats obtenus avec les deux antigènes Reiter en fonction du stade de la syphilis. Parmi les 677 sérums syphilitiques, 9 seulement donnent des résultats discordants et 7 de ces sérums proviennent de cas de syphilis latente ou traitée. Le même tableau montre également les résultats obtenus avec le plus sensible des tests « classiques », le V. D. R. L., comparés à ceux donnés par l'antigène tréponémique n° 27. Ici,

TABLEAU III. — Résultats concordants et discordants.

SYPHILIS PRÉSENTE								
RÉSULTATS	DEGRÉ DE RÉAC- TIVITÉ	BW		Meinicke		VDRL		n° 27 n° 29
		n° 27	n° 29	n° 27	n° 29	n° 27	n° 29	
Concor- dants	RF	388	385	433	427	489	478	508
	RF	33	34	49	51	57	61	20
	FR	62	59	33	28	21	19	7
	FF	7	8	6	10	3	5	51
	NN	56	61	34	38	38	40	82
Discor- dants	Total	546	547	555	554	608	603	668
	%	80,6	80,8	82	81,8	89,8	89,1	98,7
	RN	12	14	42	46	40	47	3
	NR	81	71	65	60	21	18	
	FN	14	16	6	7	4	4	6
	NF	24	29	9	10	4	5	
	Total	131	130	122	123	69	74	9
	%	19,4	19,2	18	18,2	10,2	10,9	1,3
SYPHILIS PRÉSUMÉE ABSENTE								
Concor- dants	RR	37	34	51	42	57	49	59
	RF	14	14	19	24	24	26	27
	FR	8	7	11	11	6	6	
	FF	8	7	4	3	2	2	23
	NN	250	251	192	193	208	217	302
Discor- dants	Total	317	313	277	273	297	300	391
	%	79,1	78,1	69,1	68,1	74,1	74,8	97,5
	RN	36	39	98	102	89	86	2
	NR	23	19	6	7	5	5	1
	FN	18	20	14	15	7	7	6
	NF	7	10	6	4	3	3	1
	Total	84	88	124	128	104	101	10
	%	20,9	21,9	30,9	31,9	25,9	25,2	2,5

Nombre de sérums ayant donné avec les divers couples de réactions des résultats concordants ou discordants. Les abréviations sont les mêmes que dans le tableau II.

1/10 environ des sérums donne des résultats discordants ; alors que 44 sérums qui réagissent avec le V. D. R. L. ne réagissent pas avec l'antigène Reiter n° 27, des résultats inverses sont obtenus

TABLEAU IV. — Comparaison des résultats obtenus dans les différents stades de la syphilis.

RÉAC- TIONS	STADE DE LA SYPHILIS	Nbre DE SÉRUMS	RÉSULTATS							
			Concordants					Discordants		
			Nbre de sérums	R R	R F	F F	F N	N N	Nbre de sérums	R N R N F F
N° 27 N° 29	Prénatale	23	23	20	1	1	1			
	Précoce	16	16	12	1	1	2			
	Tertiaire	140	139	131	4	1	3	1		1
	Neuro.	97	96	80	3	1	9	3	1	1
	Latente	207	204	140	8	1	24	31	3	1 2
	Traitée	194	190	125	5	2	13	45	4	2 2
VDRL, N° 27	Total	677	668	508	20	7	51	82	9	3 6
	%		98.7						1.3	
	Prénatale	23	20	17	2	1			3	1 2
	Précoce	16	16	11	2	1		2		
	Tertiaire	140	137	130	5	2			3	3
	Neuro.	97	92	79	11	2			5	3 2
	Latente	207	185	137	24	8	2	14	22	14 4 3 1
	Traitée	194	158	115	13	7	1	22	36	22 10 1 3
	Total	677	608	89	57	21	3	38	69	40 21 4 4
	%		89.8						10.2	

avec 25 sérums. Beaucoup de ces sérums proviennent également de cas de syphilis latente ou traitée.

Le diagramme (fig. 1) donne les degrés de réactivité des deux préparations tréponémiques utilisées comme antigène dans la F. C. P. R. Tant avec les sérums syphilitiques qu'avec les sérums présumés non syphilitiques, il y a un glissement vers la gauche qui montre que « l'antigène tréponémique » n° 27 possède un degré de réactivité supérieur à l'extrait protéique n° 29.

DISCUSSION.

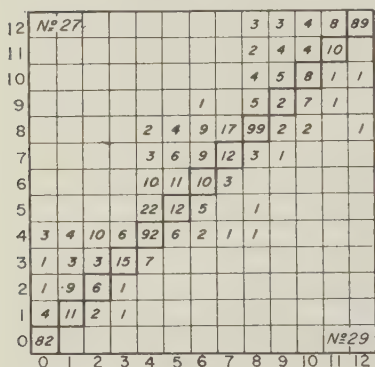
On doit insister sur le fait que ce matériel sérique, comme on l'a déjà mentionné, est un matériel sélectionné.

Les réactions « classiques » ont été effectuées avant de pratiquer la F. C. P. R. Avec ce dernier test, nous avons préféré examiner les sérums qui avaient donné des résultats discordants avec les réactions « classiques ». De ce fait, les dissociations

observées avec ce matériel doivent être beaucoup plus fréquentes qu'avec le matériel ordinaire de routine.

Les qualités des tests sérologiques dépendent de leur sensibilité et de leur spécificité. Dans la sérologie de la syphilis, on tente de pratiquer des réactions qui donnent des résultats positifs dans le maximum des cas de syphilis. Cependant, si on essaye de trop accroître la sensibilité, il en résulte une diminution de la spécificité. Avec notre matériel, c'est le V. D. R. L. qui a donné le plus grand nombre de réactions positives avec les sérums syphilitiques, mais aussi un nombre élevé de réactivités avec le reste des sérums pour lesquels les données n'indiquent aucune évidence

Syphilis présente.



Syphilis présumée absente.

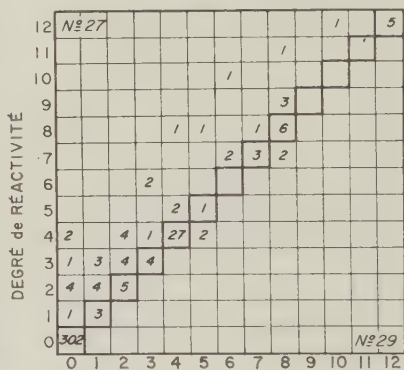


FIG. 1. — Réactivités comparées de « l'antigène tréponémique » n° 27 et de l'extract protéique » n° 29 avec des sérums de sujets syphilitiques et de sujets présumés non syphilitiques. 1-12, degrés de réactivité quantitative. En ordonnée, réactivité obtenue avec l'antigène n° 27 ; en abscisse, réactivité avec l'antigène n° 29. Les chiffres expriment le nombre de sérums ayant donné avec les antigènes n° 27 et n° 29 les réactivités indiquées par la position de ces chiffres sur les diagrammes.

de syphilis. Cependant, parmi ces sérums il y a probablement quelques sujets donnant des réactions biologiques faussement positives, mais aussi des malades atteints de syphilis non diagnostiquée ; 81 sérums n'étaient accompagnés d'aucun renseignement.

Avec les sérums de malades pour lesquels le diagnostic de syphilis a été établi, la F. C. P. R. pratiquée avec les deux antigènes Reiter présente une réactivité sensiblement analogue à celle du Meinicke, plus élevée que celle du B.-W. et seulement légèrement moindre que celle du V. D. R. L. Avec les sérums non syphilitiques la F. C. P. R. a donné un plus petit nombre

de résultats positifs que les autres tests. Cette comparaison indique donc que la F. C. P. R. possède une bonne sensibilité et une spécificité satisfaisante.

A partir des renseignements reçus et de quelques informations supplémentaires, il a été possible de classer les sérums en différents groupes selon le stade clinique de la maladie. Le groupe syphilis latente, est constitué par les sérums provenant de sujets syphilitiques n'ayant pas reçu de traitement spécifique ou qui n'ont pas présenté de signe clinique de syphilis pendant les quatre années précédant l'examen. Le dernier groupe (cas traité) inclut les sérums correspondant à divers stades de la syphilis en cours de traitement et les sérums reçus pour examen soit à la fin du traitement, soit pour contrôle pendant les quatre années suivantes. On notera que 7 des 9 cas de discordance entre les deux antigènes Reiter appartiennent à ces groupes de cas latents ou traités.

Comme on peut le voir dans le diagramme, « l'antigène tréponémique » Reiter n° 27 présente un degré de réactivité légèrement plus élevé que « l'extrait protéique » Reiter n° 29. A quels facteurs peut-on attribuer cette faible différence ? Nous ne pensons pas que l'activité plus élevée de l'antigène brut n° 27 soit due à la présence des lipides, car la protéine purifiée n° 29 en renferme également et nous avons montré précédemment [24] que l'antigène lipidique n'intervient pas dans ces deux types de préparations lorsqu'on les emploie à la dilution optimum pour la réaction protéine-antiprotéine.

On pourrait également supposer que la préparation brute renferme un antigène qui ne serait plus présent dans l'extrait protéique purifié, mais cette hypothèse doit être écartée, car si on épuise un sérum avec « l'extrait protéique » il ne réagit plus avec « l'antigène tréponémique ». Nous pensons que dans les deux types de préparations c'est le même antigène protéique qui intervient seul avec les sérums de sujets syphilitiques, mais que dans « l'extrait protéique » la protéine a subi au cours de sa purification une légère altération qui diminue un peu son activité sérologique.

RÉSUMÉ.

On expose l'ensemble des résultats obtenus dans une étude comparative de la F. C. P. R. (réaction de fixation du complément avec la protéine Reiter) et des trois tests classiques : B.-W. (réaction de Bordet-Wassermann), Meinicke et V. D. R. L., étude réalisée avec un matériel constitué par 1 078 sérums sélectionnés à partir du matériel de routine reçu dans un laboratoire de sérologie.

On a utilisé comme antigène dans la F. C. P. R. deux préparations obtenues à partir du tréponème Reiter : un produit brut « l'antigène tréponémique » et une protéine purifiée « l'extrait protéique ».

La comparaison montre que la F. C. P. R. possède une sensibilité comparable à celle des autres tests pratiqués et une spécificité un peu plus élevée que celle des autres tests.

La sensibilité de la F. C. P. R. exécutée avec « l'antigène tréponémique » brut s'est montrée un peu supérieure à celle de la F. C. P. R. réalisée avec « l'extrait protéique » purifié.

La F. C. P. R. constitue, dans le sérodiagnostic de la syphilis, une réaction simple et de valeur.

SUMMARY.

SERODIAGNOSTIC OF SYPHILIS.

COMPARATIVE STUDIES ON « CONVENTIONAL » REACTIONS AND COMPLEMENT FIXATION WITH THE PROTEIC ANTIGEN OF REITER'S TREPONEMA.

Description of the results obtained in comparative studies of the complement fixation with Reiter's protein (F. C. P. R.) and the conventional reactions : Bordet-Wassermann, Meinicke and V. D. R L., on 1078 sera taken from the routine material of a serologic laboratory.

Two preparations obtained from Reiter's treponema were used as antigen in the F. C. P. R. : crude material, the « treponemic antigen », and a purified protein, the « proteic extract ».

The results show that the F. C. P. R. sensitivity is comparable to, and its specificity somewhat higher than that of the other reactions. The sensitivity of the F. C. P. R. carried out with the crude « treponemic antigen » is somewhat higher than that of the F. C. P. R. carried out with the purified « proteic extract ».

The F. C. P. R. is a simple and reliable reaction for the diagnostic of syphilis.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GAERTGENS (W.). *Med. Klin.*, 1929, **25**, 390.
- [2] GAERTGENS (W.). *Z. Immun. Forsch.*, 1929, **63**, 398.
- [3] GAERTGENS (W.). *Z. Immun. Forsch.*, 1932, **73**, 527.
- [4] BECK (A.). *J. Hyg.*, 1939, **39**, 298.
- [5] EAGLE (H.) et HOGAN (R. B.). *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 215.
- [6] VOGELSANG (Th. M.). *Klin. Wschr.*, 1937, **16**, 1721.
- [7] VOGELSANG (Th. M.). *Klin. Wschr.*, 1938, **17**, 1370.

- [8] VOGELSANG (Th. M.). *Séro-diagnostic de la syphilis*, Bergen, 1940, J. W. Eide, édit.
 - [9] VOGELSANG (Th. M.). *Acta med. scand.*, 1946, **124**, 103.
 - [10] ALESSANDRO (G. d'), ODDO (F. G.) COMES (R.) et DARDANONI (L.). *Riv. Ist. sieroter. ital.*, 1949, **24**, 134.
 - [11] ALESSANDRO (G. d'), ODDO (F. G.) et DARDANONI (L.). *J. ven. Dis.*, 1950, **31**, 314.
 - [12] ALESSANDRO (G. d') et DARDANONI (L.). *Amer. J. Syph.*, 1953, **37**, 137.
 - [13] BRUIJN (J. H. de). *Antonie van Leeuwenhoeck*, 1957, **23**, 201.
 - [14] BRUIJN (J. H. de) et BEKKER (J. H.). *Tijdschr. Geneeskunde*, 1957, **101**, 1615.
 - [15] CANNEFAX (G. R.) et GARSON (W.). *Publ. Hlth Rep.*, 1957, **72**, 335.
 - [16] REIN (C. R.), KELCEC (L. C.), ALESSANDRO (G. d') et BRUIJN (J. H. de). *Eight american Symposium on recent advances in the study of ven. dis.* Washington, D. C., avril 1957, 24-25.
 - [17] KJELLANDER (J.), SIEVERS (O.) et VOGELSANG (Th. M.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1959, **47**, 373.
 - [18] PILLOT (J.) et FAURE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 196.
 - [19] PILLOT (J.), DUPOUEY (P.) et FAURE (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 734.
 - [20] EAGLE (H.). *J. Lab. clin. Med.*, 1936, **22**, 300.
 - [21] HARRIS (A.), ROSENBERG (A. A.) et VECCHIO (E. R. del). *J. ven. Dis.*, 1948, **29**, 72 et 313.
 - [22] VOGELSANG (Th. M.) et HAALAND (R.). *Brit. J. ven. Dis.*, 1951, **27**, 52.
 - [23] KOLMER (J. A.) et LYNCH (E. R.). *Am. J. clin. Path.*, 1942, **42**, 109.
 - [24] FAURE (M.) et PILLOT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 729.
-

RECHERCHES SUR LE VIRUS DU SARCOME DE ROUS PASSÉ EN SÉRIE DANS L'ŒUF

par Philippe VIGIER et Alice GOLDE (*) (**).

(Laboratoire Pasteur, Institut du Radium, Paris.)

On sait, depuis les premières recherches de Rous et Murphy (1911 [26]) que l'inoculation de broyats cellulaires ou acellulaires de sarcome de Rous sur la membrane chorio-allantoïdienne (MCA) de l'œuf de poule embryonné, y provoque des tumeurs atteignant plusieurs grammes et qui peuvent être reproduites en série par réinoculation de leurs extraits dans de nouveaux œufs. Indépendamment de ces tumeurs, ou en même temps qu'elles, on peut aussi reproduire en série les deux autres types de lésions déterminées par le virus de Rous : pocks prolifératifs de l'ectoderme chorio-allantoïdien (Keogh, 1938 [14]) et hémorragies de l'embryon et de ses annexes (Milford et Duran-Reynals, 1943 [15]).

Des recherches plus récentes ont montré que la multiplication du virus qui accompagne le développement des pocks et des sarcomes de la MCA est très comparable à celle qui va de pair avec la croissance des sarcomes chez le poulet, et que le titre en virus des tumeurs chorio-allantoïdiennes est aussi élevé que celui des sarcomes les plus riches chez ce dernier (Harris, 1954 [13], Prince, 1958 [19]).

Bryan et ses collaborateurs [4] ont observé, d'autre part, que le passage en série, chez les poulets jeunes de souche sensible, du virus des sarcomes sous-cutanés à développement rapide produits par les fortes doses infectieuses accroît progressivement le titre maximum en virus de ces sarcomes. Après 36 passages dans ces conditions, ce titre s'est accru de 30 fois et au bout de 60 passages, il a atteint $10^{9.0}$ unités-pock (UP) par gramme (Prince, 1960 [21]).

Ces faits nous ont conduits à rechercher si le titre en virus des sarcomes chorio-allantoïdiens de l'œuf peut de même être accru par passages en série d'extraits de tumeurs à croissance maximum. La méthode suivie a été celle adoptée par Bryan et ses collaborateurs pour obtenir leurs sarcomes à titre élevé chez le

(*) Travail effectué avec l'aide du Damon Runyon Memorial Fund, du Commissariat à l'Energie Atomique et de la Sécurité Sociale.

(**) Manuscrit reçu le 20 octobre 1960.

poulet. De fortes doses de virus ont été inoculées dans des œufs, et les extraits des plus grosses tumeurs chorio-allantoïdiennes ont été réinoculés en série dans de nouveaux œufs de même âge et de même lignée sensible, la teneur en virus des tumeurs étant déterminée à chaque passage.

L'adsorption apparente du virus à la surface des cellules observée au microscope électronique (Bernhard, Oberling et Vigier, 1956 [3], Epstein, 1957 [41], Haguénau, Dalton et Moloney, 1959 [12]) et les bons résultats obtenus dans la purification des extraits infectieux de sarcome par l'emploi de trypsine (Carr et Harris, 1951 [6], Moloney, 1956 [46]) nous ont conduits par ailleurs, à rechercher, au cours des passages, si les extraits acellulaires de tumeurs ne pourraient être enrichis en virus par digestion trypsique de leurs débris cellulaires.

On a également étudié, au cours de ces recherches, la localisation du virus dans les tumeurs et la relation entre le nombre de cellules productrices de virus (centres infectieux) détectables par ensemencement dans l'œuf et le titre en virus des sarcomes. Le but de cette étude était de vérifier sur les tumeurs solides les observations faites *in vitro* sur les cellules d'embryon de poule infectées en primo-culture avec le virus de Rous, soit :

1° que le virus produit se retrouve presque entièrement hors des cellules ;

2° que le nombre des centres infectieux détectables est proportionnel à la quantité globale de virus produit par la population cellulaire (Vigier et Golde, 1959 [25]).

MATÉRIEL, MÉTHODES et EXPÉRIENCES.

PASSAGE DU VIRUS DANS LES ŒUFS. — Trois séries de passage (I, II, III) ont été effectuées à partir de deux sarcomes à croissance rapide et haut titre viral ($> 10^6$ unités-pock/g) de jeunes poulets de 2 à 3 mois ; ces sarcomes étaient produits par le virus de la souche standard de Bryan adaptée depuis 1956 aux lignées Leghorn blanches et Sussex utilisées dans nos recherches antérieures (Vigier et Golde, 1959).

La première série (I) a été maintenue durant 20 passages jusqu'à ce jour. Les deux autres séries (II et III) ont été interrompues au bout de 13 passages après qu'on eût vu qu'elles se comportaient pratiquement comme la première quant à la taille des tumeurs et leur titre viral.

Les œufs pour les passages et les titrages du virus et des centres infectieux provenaient tous de la lignée Leghorn blanche utilisée antérieurement. Les passages ont été effectués de la même manière dans les trois séries. Un extrait acellulaire à 20 p. 100

du sarcome d'origine a été inoculé, à la dose de $0,1 \text{ cm}^3$, sur la MCA de 8 œufs de 11 jours, qui ont été sacrifiés huit jours après. Les 2 ou 3 plus grosses tumeurs chorio-allantoïdiennes, prélevées stérilement, ont servi à préparer un nouvel extrait à 20 p. 100, qui a été réinoculé dans 8 œufs de 8 jours seulement cette fois. Les plus gros sarcomes de ces œufs ont été prélevés, extraits et réinoculés de même dans de nouveaux œufs de 8 jours, et ainsi à chacun des passages suivants.

L'âge d'inoculation de 8 jours des œufs a été respecté dans la règle, à la suite d'observations suggérant que les sarcomes des œufs inoculés tôt pouvaient être particulièrement riches en virus. Des recherches ultérieures ont toutefois montré qu'il n'y a, en fait, pas de différence de taille ni de titre entre les sarcomes ayant évolué le même temps dans les œufs de 8, 9, 10, 11 ou 12 jours. En conséquence, des œufs de plus de 8 jours ont été utilisés à certains des derniers passages.

Les extraits acellulaires à chaque passage (extraits acellulaires bruts) ont été préparés par un broyage d'une minute (au broyeur rotatif à couteaux Prolabo) des sarcomes congelés à -70°C , puis décongelés dans du PBS (Dulbecco, 1954 [8]) sans calcium ni magnésium (PBS-) additionné de 1 mg d'hyaluronidase pour 20 cm^3 et d'antibiotiques. Le broyat, qui ne renferme plus de cellules visibles au microscope, est ensuite centrifugé dix minutes à $3\,000 \text{ t/mn}$, pour éliminer les plus gros débris cellulaires.

La dose d'extrait a été de $0,1 \text{ cm}^3$ par œuf dans tous les cas, la concentration étant soit de 20, soit de 10 p. 100, selon la taille des sarcomes et les besoins en virus pour d'autres recherches. Aucune différence de taille ou de titre viral n'a été constatée au demeurant entre les tumeurs produites par ces deux concentrations.

Le délai d'évolution des sarcomes, de huit jours au premier passage, a dû être porté à dix jours dans les quatre passages suivants, en raison d'un ralentissement de la croissance tumorale observé dans les 3 souches. À partir du sixième passage, et à tous les suivants, il a été ramené à sept jours, du fait de la croissance plus rapide des tumeurs et de la mortalité déjà élevée des œufs au bout de ce temps (voir résultats).

Le titrage des extraits tumoraux, à chaque passage, a été effectué par la numération des pocks produits sur la MCA d'œufs de 11 ou 12 jours, selon une technique voisine de celle décrite par Groupe et coll. (1957) et reprise par Dougherty, Stewart et Morgan (1960 [7]). Les œufs inoculés en position horizontale, après décollement de la MCA, sont ensuite remis à incuber en position verticale, la chambre à air vers le haut, ce qui ramène la MCA décollée au contact de la membrane coquillière et répartit uniformément à sa surface le liquide inoculé ($0,05$ à $0,1 \text{ cm}^3$). Les

pocks sont comptés au bout de sept jours et le titre est donné par la moyenne de leurs logarithmes décimaux (Prince, 1958 [18], Vigier, 1959 [24]). Des expériences comparatives ont montré que cette méthode donne des titres identiques à ceux obtenus dans les œufs incubés horizontalement selon la méthode originale de Keogh (1938 [14]) réintroduite par Rubin (1955 [22]) ; l'erreur standard sur la moyenne, par contre, est nettement réduite dans l'incubation verticale : moins de 0,25 au lieu de 0,35 \log_{10} pour 5 œufs avec les extraits bruts, et moins de 0,15 \log_{10} avec les extraits trypsinés, dans presque tous les cas.

TRAITEMENT A LA TRYPSINE DES EXTRAITS BRUTS ET DE LEURS DÉBRIS CELLULAIRES. — A partir du neuvième passage de la série I et à quelques uns des derniers passages des séries II et III, les extraits bruts de sarcome non centrifugés ont été incubés vingt minutes au bain-marie à 37° C, avec un volume égal de trypsine (Difco) à 0,25 p. 100 dans du PBS-, puis centrifugés et titrés parallèlement à l'extrait brut non trypsiné. Une fois observé que ce traitement accroît de manière nette le titre en virus, la méthode d'extraction a été modifiée comme suit, pour voir si le virus additionnel provenait bien de l'action de la trypsine sur les débris cellulaires encore présents dans l'extrait brut non centrifugé :

L'extrait brut est d'abord centrifugé dix minutes à 3 000 t/mn, comme dans la préparation standard, puis le culot de débris est incubé vingt minutes à 37° C dans un volume de trypsine à 0,25 p. 100 égal au volume initial d'extrait. L'extrait trypsique est ensuite centrifugé dix minutes à 3 000 t/mn pour éliminer les débris résiduels, et ajouté au premier surnageant brut pour titrage. Cette méthode d'extraction a donné des résultats comparables à ceux de la précédente ; elle a donc été adoptée au lieu de l'extraction simple, pour les derniers passages de la souche I, les extraits étant alors additionnés de 1/10 de sérum de veau, pour neutraliser la trypsine restante.

LOCALISATION DU VIRUS DANS LES TUMEURS ET NOMBRE DE CENTRES INFECTIEUX. — 5 sarcomes chorio-allantoïdiens de passages différents ont été prélevés, lavés au PBS-, essorés sur papier-filtre stérile, pesés, hachés en fragments de 1 ou 2 mm, puis incubés vingt minutes à 37° C dans une solution de trypsine à 0,25 p. 100 additionnée de 1 mg d'hyaluronidase pour 20 cm³. On a utilisé 10 cm³ de solution trypsique pour 1 g de sarcome, les fragments étant soumis à une agitation magnétique ininterrompue. Au bout des vingt minutes d'incubation, l'action de la trypsine a été arrêtée par addition de 1/10 de sérum de veau et les fragments résiduels ont été essorés et pesés pour déter-

miner le poids effectif de sarcome mis en suspension cellulaire. Les cellules isolées par la trypsine ont ensuite été sédimentées par une centrifugation de cinq minutes à 1 500 t/min. lavées deux fois dans du milieu 199 (Morgan et coll., 1950 [47]) additionné de 1/10 de sérum de veau, remises en suspension dans 10 cm³ du même mélange et comptées.

Au terme de ces opérations, on a titré, par ensemencement sur la MCA :

a) Le virus libre (VL) présent dans l'extrait trypsiné centrifugé, additionné des deux liquides de lavage des cellules.

b) Le virus lié aux cellules (VLC) récupéré après éclatement de 1 cm³ de la suspension de cellules lavées, par trois congélations successives à — 70° C, au mélange alcool-neige carbonique, suivies chacune d'une décongélation rapide au bain-marie à 37° C.

c) Les centres infectieux (CI) pour un nombre connu de cellules entières lavées..

Le virus libre et le virus lié aux cellules ont été titrés selon la méthode décrite pour les extraits. Les centres infectieux ont été comptés par la méthode ancienne avec incubation horizontale (Vigier et Golde, 1959 [25]), les cellules tendant à s'accumuler au pourtour de la zone décollée de la MCA, lors de l'incubation verticale. Le nombre de cellules inoculées a été de 100 à 1 000 par œuf, dans 0,05 cm³.

RÉSULTATS.

Les résultats des passages de la série I sont rassemblés dans la figure 1. On y voit que le poids moyen des sarcomes chorio-allantoïdiens est tombé après le premier passage au voisinage de 0.1 g pour huit jours d'incubation, jusqu'au cinquième passage inclus, puis qu'il est remonté brusquement au sixième passage au voisinage de 1 g pour sept jours d'incubation. Sauf au seizième passage, où il est retombé à 0.3 g pour sept jours d'incubation, il s'est ensuite maintenu à ce niveau, les plus grosses tumeurs, uniques ou multiples, dépassant généralement 2 g par œuf.

Ainsi qu'on l'a dit, la mortalité croissante des œufs inoculés après huit jours d'incubation a obligé à sacrifier systématiquement les œufs au bout de sept jours, à partir du sixième passage. Au cinquième passage, en effet, 50 p. 100 des œufs tumoraux ont été trouvés morts, dans ce délai, la mortalité se maintenant à 30 à 60 p. 100 des œufs dans les passages ultérieurs. Les embryons morts se trouvaient pour la plupart dans les œufs porteurs de tumeurs de plus de 1 g, et la plupart

présentaient la maladie hémorragique de Duran-Reynals (Milford et Duran-Reynals, 1943 [15]). Les « blebs » hémorragiques caractéristiques de la maladie, ont été observés fréquemment aussi chez les embryons survivants.

Le titre en virus des sarcomes chorio-allantoïdiens, déterminé par titrage des extraits bruts, n'a pas été mesuré dans les deux premiers passages. Il est demeuré compris entre $10^{5,5}$ et $10^{6,0}$

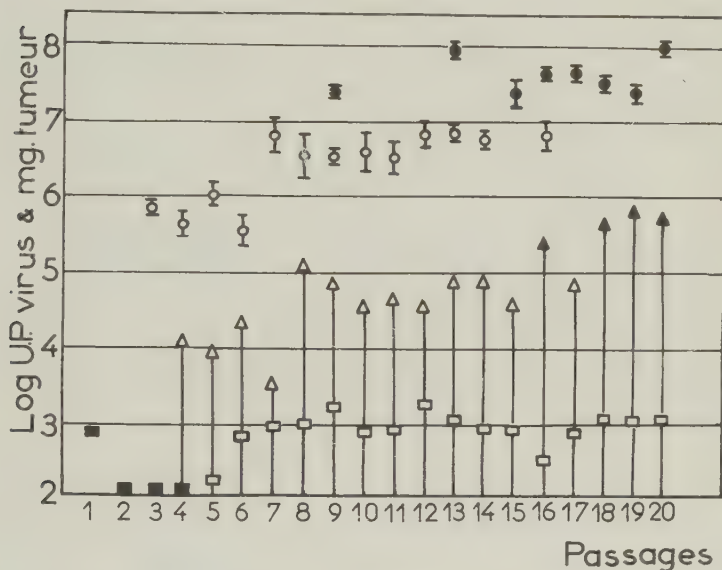


FIG. Titre en virus (log. up/gramme) et poids moyen (log. milligrammes) des sarcomes chorio-allantoïdiens dans la série 1 des passages dans l'œuf.

Cercles blancs : titre des extraits bruts de sarcome ; cercles noirs : titre des extraits trypsinés. Triangles blancs : dose inoculée par œuf (log. UP), extraits bruts ; triangles noirs : dose par œuf, extraits trypsinés. Rectangles noirs : poids moyen des sarcomes au bout de huit jours ; rectangles blancs : poids moyen des sarcomes au bout de sept jours.

UP gramme du troisième au sixième passage inclus pour augmenter ensuite brusquement à $10^{6,8}$ au septième passage. Il s'est dès lors stabilisé entre $10^{6,5}$ et $10^{7,0}$ UP/gramme. L'élévation brusque du titre du septième passage a suivi celle de la taille du sixième passage, mais ce dernier ne s'est cependant pas lui-même accompagné d'une élévation correspondante du titre.

L'augmentation du titre en virus des sarcomes à partir du septième passage a entraîné une augmentation correspondante

de la dose de virus inoculée, puisqu'on a continué d'injecter de l'extrait à 10 ou 20 p. 100 dans les passages ultérieurs. Dans plusieurs expériences, en conséquence, on a réduit la dose inoculée au niveau de celles des premiers passages, par une dilution au 1/10 de l'extrait brut; les sarcomes produits par 0,1 cm³ d'extrait dilué n'ont présenté aucune réduction de taille ou de titre par rapport à ceux produits par la même dose d'extrait non dilué.

Le comportement des séries II et III a été très comparable à celui de la série I. Ici, encore, les tumeurs des premiers passages, à partir du second, sont demeurées au voisinage de 0,1 g pour huit jours d'incubation, avec un titre inférieur à 10^{6,0} UP/g (10^{6,2} au cinquième passage de la souche II). Leur poids moyen s'est ensuite élevé brusquement à 1 g environ pour sept jours d'incubation, cependant que leur titre a augmenté brusquement aussi pour se stabiliser entre 10^{6,5} et 10^{7,0} UP/g. Dans les deux souches, l'augmentation de la taille et celle du titre des tumeurs se sont produites, cette fois, simultanément au sixième passage.

EXTRAITS TRYPSINÉS. — Le tableau I donne les résultats des trois expériences, dans lesquelles les extraits bruts non centrifugés ont été incubés avec un volume égal de trypsine à 0,25 p. 100. On y voit que le titre en virus a été augmenté de 3 à 10 fois (0,5-1,0 log₁₀) par le traitement.

TABLEAU I. — Titres comparés (log₁₀ UP/g de tumeur) des extraits de sarcomes chorio-allantoïdiens avant et après digestion tryptique.

EXP.	TRAITEMENT DE L'EXTRAIT	TITRE	EXP.	TRAITEMENT DE L'EXTRAIT	TITRE
1-a .	Extrait brut centrifugé + trypsine 0,25 %	7,93 (± 0,10)	4-a	Extrait brut centrifugé + trypsine 0,25 %	6,85 (± 0,12)
b .	Même extrait non traité	6,88 (± 0,12)	b	Même extrait non traité	6,87 (± 0,10)
2-a .	Id 1-a	7,34 (± 0,17)	5-a	Extrait brut centrifugé + extrait tryptique débris	7,73 (± 0,11)
b .	Id 1-b	6,80 (± 0,15)	b	Extrait brut centrifugé + trypsine 0,25 %	7,35 (± 0,13)
			c	Même extrait non traité	7,29 (± 0,04)
3-a .	Id 1-a	7,75 (± 0,27)	6-a	Id 5-a	7,66 (± 0,05)
b .	Id 1-b	6,68 (± 0,20)	b	Id 5-c	6,81 (± 0,18)

Une augmentation comparable a été observée après la digestion trypsique du culot de débris de l'extrait brut (expériences 5 et 6).

Par contre, l'addition d'un volume égal de trypsine à 0,25 p. 100 à l'extrait brut centrifugé n'entraîne aucune augmentation de titre (expériences 4 et 5). On voit par ailleurs sur le graphique des passages que le titre des extraits tryptiques est demeuré compris entre $10^{7,5}$ et $10^{8,0}$ UP/g de sarcome, alors que les extraits bruts ne dépassent pas $10^{7,0}$ UP/g.

LOCALISATION DU VIRUS ET CENTRES INFECTIEUX. — Le tableau II donne les résultats des titrages du virus libre (VL), du virus lié aux cellules (VLC) et du nombre de centres infectieux (CI) pour 1 g de sarcome trypsiné, dans 5 expériences. On y a également fait figurer le poids de sarcome effectivement trypsiné, légèrement inférieur au poids original de la tumeur prélevée et le nombre total de cellules par gramme, comptées à l'hématimètre.

TABEAU II. — Sarcomes MCA trypsinés : virus libre (VL), virus lié aux cellules (VLC) et nombre de centres infectieux (CI) par gramme (\log_{10}). NTC : Log nombre total de cellules/gramme ; PS : poids de sarcome trypsiné (grammes).

EXPÉRIENCES*	PS	NTC	VL	VLC	CI	VL/ VLC	VL/CI	CI/ NTC
1	0,5	7,8	6,5	4,8	5,2	1,7	1,3	— 2,6
2	0,5	7,3	6,5	4,1	5,4	2,4	1,1	— 1,9
3	1,0	7,5	7,2	5,4	6,0	1,8	1,2	— 1,5
4	0,8	7,4	7,4	4,9	6,2	2,5	1,2	— 1,2
5	1,2	7,6	7,5	4,4	6,3	3,1	1,2	— 1,3

(*) Expériences rangées selon la richesse en virus (VL) des sarcomes.

On voit que le virus libre est de 50 à 1 000 fois plus abondant que le virus lié aux cellules et représente ainsi la presque totalité du virus tumoral. Le nombre des centres infectieux détectables par ensemencement sur la MCA, d'autre part, est compris entre le dixième et le vingtième du nombre total d'unités-pock de virus pour le même poids de sarcome et la corrélation entre ces deux facteurs est très significative ($r > 0,9$; $P < 0,01$).

Le nombre total des cellules par gramme après la trypsination des tumeurs est relativement constant, en sorte qu'une corrélation significative s'observe aussi entre le pourcentage des centres infectieux détectables par rapport au nombre total de cellules et le titre en virus des sarcomes. En première approximation, un sarcome titrant $10^{6,5}$ UP/g renferme environ 1 p. 100 de centres infectieux et un sarcome titrant $10^{7,5}$ UP/g près de 10 p. 100.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Les résultats des passages en série du sarcome dans les œufs confirment, à première vue, ceux obtenus par passages sélectifs sur le poulet par Bryan et ses collaborateurs. En ne tenant compte que des extraits bruts, seuls comparables entre eux depuis le début, l'augmentation du titre viral observée dans les souches d'œuf est d'environ dix fois contre trente fois pour la souche de Bryan. Mais le nombre de passages dans l'œuf n'a été que de 13 dans les souches II et III et n'atteint que 20 jusqu'à présent dans la souche I contre plus de 60 aujourd'hui pour la souche de Bryan. On peut donc espérer de nouvelles hausses du titre des tumeurs chorio-allantoïdiennes dans les passages ultérieurs de la souche I dans l'œuf.

Comme on l'a vu, la hausse du titre ne s'est toutefois pas effectuée progressivement. Elle résulte, au contraire, de l'augmentation brusque et unique observée au septième passage pour la souche I et au sixième passage pour les séries II et III. Cette augmentation a simplement été suivie d'une stabilisation du titre dans les passages ultérieurs jusqu'à ce jour. Une augmentation brusque d'environ dix fois a eu lieu également dans la souche de Bryan, dès le second passage, le titre viral des sarcomes ne s'élevant plus ensuite que très lentement (Bryan, 1958 [4]). On peut penser, en conséquence, que le mécanisme des élévations du titre observées est l'apparition brusque et la sélection rapide, dans le délai d'un passage, de mutants ou de variants du virus à multiplication accélérée. Ces mutants ou variants seraient eux-mêmes produits par des cellules à croissance plus rapide, comme le donne à penser l'augmentation brusque du poids moyen des sarcomes chorio-allantoïdiens au sixième passage dans les trois souches. Le fait que cette dernière précède d'un passage celle du titre viral dans la série I suggère même un processus en deux temps : d'abord une sélection de cellules à croissance rapide, puis une augmentation de la production ou de la libération du virus par ces cellules. Il ne s'agit là, naturellement, que d'hypothèses.

On n'a pas recherché si le virus adapté à l'œuf donne aussi des sarcomes à titre viral augmenté chez le poulet. Par contre, la croissance du virus de la série I dans les cultures semi-confluentes de cellules d'embryon de poulet a été trouvée très comparable à celle du virus d'un sarcome de la souche à haut titre de Bryan (1) : $10^{5,5}$ - $10^{6,2}$ UP pour $10^{5,3}$ - $10^{5,7}$ cellules, au bout de quatre à cinq

(1) Nous tenons à remercier ici le Dr Bryan, qui a bien voulu nous envoyer une tumeur de sa souche à haut titre, dont le virus a servi dans diverses recherches.

jours, avec des multiplicités d'infection de 0,1 à 3 UP/cellule (Golde et Vigier, en préparation).

Le virus de notre série I n'a pas présenté toutefois, jusqu'à présent, la thermorésistance accrue observée par Prince (1960, [21]) avec le virus à haut titre de Bryan. Nous n'avons d'ailleurs pas observé non plus de thermorésistance plus élevée du virus du sarcome mis à notre disposition par Bryan.

L'augmentation de trois à dix fois du titre en virus par digestion trypsique des extraits tumoraux non centrifugés ou de leurs débris cellulaires après centrifugation paraît confirmer que la majeure partie du virus est attachée aux débris, d'où la trypsine le libère. Il pourrait s'agir d'une adsorption sur les fragments de membrane, comme le suggèrent les micrographies électroniques. Mais il est aussi possible que le virus soit agrégé en amas sédimentables au moment de l'extraction, sous l'action d'inhibiteurs ou d'anticorps (Carr, 1944 [5]), la trypsine digérant alors ces agrégats.

On peut se demander, d'autre part, si le titre viral des tumeurs de poulet de la souche de Bryan peut de même être encore augmenté par la digestion trypsique ; mais l'expérience reste à faire. Il serait également intéressant d'étudier l'action de la trypsine sur d'autres tumeurs à virus de poule ou d'autres espèces, ainsi que sur des tumeurs apparemment non virales.

Le fait que la presque totalité du virus des sarcomes trypsinés sans broyage se retrouve dans le liquide d'extraction et non dans les cellules est en accord avec les observations antérieures sur les primo-cultures de cellules d'embryon infectées avec le virus de Rous (Vigier et Golde, 1959 [25]). La proportion du virus libre par rapport au virus lié aux cellules est même très supérieure dans les sarcomes, en raison peut-être, d'une meilleure extraction du virus adsorbé sur les cellules. Une partie des cellules, peut-être même la majeure partie, doivent aussi être détruites lors de la digestion trypsique, le virus libre s'en trouvant accru d'autant. Il est difficile de chiffrer cette destruction ; cependant, en comptant les noyaux de sarcomes de jeunes poulets, Bather (1954 [1]), a trouvé 30×10^7 cellules/g, contre $2-6 \times 10^7$ cellules dans nos expériences, ce qui suggère que la fraction de cellules détruites pourrait atteindre 80 à 95 p. 100. Toutefois, la mesure à l'hémocrite du volume de nombres connus de cellules, dont la densité est voisine de 1, donne, pour 1 cm^3 , des chiffres plus proches des nôtres que de ceux de Bather. De toute manière, même en admettant que le titre du virus lié aux cellules doive être multiplié par 20, il demeure très inférieur à celui du virus libre, puisque ce dernier est cinquante à mille fois plus élevé.

On a déjà discuté, à propos des cultures d'embryons infectées, la signification de cette prépondérance du virus libre. Elle suggère

que le virus de Rous ne devient infectieux qu'en sortant des cellules, probablement par « emprunt » d'un « manteau » de membrane cellulaire, ainsi que le donnent à penser les micrographies électroniques (Bernhard, 1958 [2]).

La corrélation étroite entre le nombre de centres infectieux détectables et le titre en virus des sarcomes est en accord avec les résultats de Prince (1959 [20]), qui a montré que le nombre des centres infectieux dans les cultures de cellules de sarcomes est proportionnel au titre initial du virus dans ces derniers. Une corrélation semblable avait été signalée antérieurement par Epstein (1956 [10]) entre le nombre des cellules de sarcome ascitique renfermant des particules virales visibles au microscope électronique et le titre en virus des ascites.

Les résultats numériques de Prince et Epstein sont très comparables puisque le premier a trouvé 1 centre infectieux pour 1 à 5 UP de virus dans le sarcome d'origine, après une semaine de culture ou davantage, et le second 1 cellule renfermant les particules virales pour 2 à 8 DT50 sur le poulet, 1 DT50 correspondant à environ 0,7 UP dans l'œuf (Vigier, 1959 [24]). La proportion du virus par rapport aux centres infectieux est un peu plus élevée dans nos expériences, 10 à 20 UP pour 1 CI, cette différence pouvant tenir à une meilleure extraction du virus dans ces dernières.

La corrélation entre le pourcentage des centres infectieux par rapport au nombre total de cellules et le titre en virus des sarcomes est, on l'a vu, un corollaire de la précédente. Nous trouvons ainsi une proportion de centres infectieux dix fois plus faible environ, pour le même titre en virus des sarcomes, que celle trouvée par Prince : 1 CI pour 15 cellules, pour un titre de $10^{7,5}$ UP/g à 1 CI pour 400 cellules, pour $10^{6,5}$, contre 1 CI pour 2 cellules pour $10^{7,3}$ UP/g à 1 CI pour 600 cellules pour $10^{5,3}$ UP/g.

Les résultats d'Edlinger (1958 [9]) sur des sarcomes de poussins et d'œufs sont plus proches des nôtres : 1 CI pour 20 cellules à 1 CI pour 1 000 cellules, mais cet auteur n'a titré que le virus lié aux cellules, ce qui ne permet pas de comparaison par rapport au titre en virus des tumeurs de départ.

Les premiers résultats de Rubin (1955 [22]) sont difficilement comparables aux nôtres pour la même raison. Partant de tumeurs passées en série sur des jeunes poulets il a trouvé, toutefois, une proportion de centres infectieux plus élevée que nous, du même ordre que celle rapportée par Prince pour ses tumeurs les plus riches en virus : 1 CI pour 2 à 17 cellules.

Ces faits peuvent s'interpréter de deux manières au moins. On peut admettre :

1° Que toutes les cellules sont productrices de virus, mais qu'on n'en détecte qu'une fraction, d'autant plus élevée que le titre en

virus des sarcomes est haut. Ce qui revient encore à dire que la vitesse moyenne de production du virus par les cellules est d'autant plus grande que le titre est haut et qu'on ne détecte que les cellules ayant produit leur virus dans un temps donné.

2° Qu'une fraction seulement des cellules produisent du virus, à une vitesse moyenne comparable d'une tumeur à l'autre, cette fraction étant proportionnelle au titre en virus du sarcome.

Sur la base de ses premiers résultats (Rubin, 1955 [22]), a postulé que toutes les cellules sarcomateuses sont productrices de virus et que leur détection n'est qu'un problème de temps et de système efficace. Ses recherches ultérieures sur les cellules infectées en culture ont montré qu'effectivement la détection des centres infectieux, par la méthode plus précise des « plaques » sous agar, dépend du délai dans lequel le virus est produit après ensemencement (Rubin, 1960 [23]. Et les résultats récents de Prince (1960 [24]) suggèrent qu'il en va de même pour la détection des centres infectieux sur la MCA.

Ceci n'exclut pas pour autant que, dans certains sarcomes, une partie seulement des cellules produisent du virus. Ainsi que l'a montré Prince (1959 [20], 1960 [24]), en effet, certaines particules virales peuvent être à l'origine de clones de cellules sarcomateuses non productrices de virus, *in vivo* comme *in vitro*. Les cellules non productrices n'étant pas surinfectables par le virus de Rous, ces clones peuvent coexister avec les clones de cellules productrices au sein d'une même tumeur.

Un dernier intérêt, purement pratique, des sarcomes produits dans l'œuf, est de permettre facilement aux laboratoires ne disposant pas d'animaleries de produire rapidement des quantités importantes de virus. On peut aussi utiliser le virus de cultures infectées, mais il est moins aisé d'en obtenir de grandes quantités, puisqu'il faut environ 4×10^8 cellules dans 1 l de milieu (Golde et Vigier, en préparation) pour avoir l'équivalent du virus extrait de 10 g de sarcome d'œuf.

RÉSUMÉ.

1° Le virus du sarcome de Rous a été passé en série dans l'œuf par inoculation sur la membrane chorio-allantoïdienne des extraits acellulaires des plus gros sarcomes à chaque passage. Vingt passages ont été effectués à ce jour.

Dans trois séries de passages indépendantes, le poids moyen des sarcomes chorio-allantoïdiens a baissé après le premier passage, puis a augmenté brusquement au sixième passage, pour se stabiliser aux environs de 1 g par œuf pour sept jours d'incubation.

Le titre en virus des extraits bruts des sarcomes s'est élevé simultanément, en un passage dans les trois séries, de $10^{5.5}$ - $10^{6.0}$ à $10^{6.5}$ - $10^{7.0}$ UP/g.

2° La quantité de virus extraite des sarcomes par broyage mécanique a pu être accrue de trois à dix fois par une digestion trypsique des extraits bruts ou de leurs débris cellulaires après centrifugation. On a ainsi obtenu jusqu'à $10^{8.0}$ UP/g de sarcome.

3° La digestion trypsique des sarcomes non broyés a permis d'en isoler les cellules et de séparer le virus extracellulaire libre et le virus lié aux cellules. Le virus libre ainsi obtenu a été trouvé cinquante à mille fois plus abondant que le virus lié aux cellules. Le titrage dans l'œuf des cellules productrices de virus (centres infectieux) a montré, d'autre part, que leur nombre est proportionnel au titre en virus des sarcomes et compris entre 1 p. 100 et 10 p. 100 environ, pour les titres de $10^{6.5}$ à $10^{7.5}$ UP/g de sarcome.

SUMMARY

INVESTIGATIONS ON ROUS SARCOMA VIRUS PASSAGED SERIALY IN EGGS.

1. Rous sarcoma virus has been carried for 20 serial passages in 8 day-old eggs, by CAM inoculation of acellular extracts of the largest tumors at each passage.

In three independent series of passages the mean weight of CAM sarcomas decreased initially following the first passage, then increased suddenly at the 6th passage to about 1 g per egg for 7 days of incubation. The virus titer of the sarcomas increased simultaneously within one passage from $10^{5.5}$ - $10^{6.0}$ PFU/g to $10^{6.5}$ - $10^{7.0}$ PFU/g. No further increase of size or virus content of the sarcomas has been observed to-date.

2. The amount of virus extracted from tumors by mechanical grinding in PBS plus hyaluronidase was increased 3 to 10-fold by tryptic digestion of the extracts before centrifugation, or of the cell debris following centrifugation. The maximum titer obtained by this method was $10^{8.0}$ UP/g.

3. Tryptic digestion of non-ground sarcomas has permitted separation of extracellular free virus and of cell-attached virus. The amount of free virus obtained in this manner was 50 to 1 000 times higher than that of cell-attached virus. The number of virus producing cells (infective centers) detected by pock production on the CAM is proportional to the virus titer of tumors; i. e., from 1 p. 100 to 10 p. 100 for titers of $10^{6.5}$ to $10^{7.5}$ UP/g of sarcoma.

*
* *

Nous tenons à remercier le Dr Raymond Latarjet pour sa critique de la première rédaction de cet article, ainsi que M^{lle} Jeanine Crochet pour sa précieuse collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BATHER (R.). *Brit. J. Cancer*, 1954, **8**, 132.
- [2] BERNHARD (W.). *Cancer Res.*, 1958, **18**, 491.
- [3] BERNHARD (W.), OBERLING (Ch.) et VIGIER (P.). *Bull. Cancer*, 1956, **43**, 407.
- [4] BRYAN (W. R.). *Abstracts of papers ; Seventh International Cancer Congress*, Londres, 1958, 109.
- [5] CARR (J. G.). *Brit. J. exp. Path.*, 1944, **25**, 56.
- [6] CARR (J. G.) et HARRIS (R. J. C.). *Brit. J. Cancer*, 1951, **5**, 83.
- [7] DOUGHERTY (R. M.), STEWART (J. A.) et MORGAN (H. R.). *Virology*, 1960, **11**, 349.
- [8] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 183.
- [9] EDLINGER (E.). *Acta biol. med. germanica*, 1958, **1**, 486.
- [10] EPSTEIN (M. A.). *Brit. J. Cancer*, 1956, **10**, 33.
- [11] EPSTEIN (M. A.). *Brit. J. Cancer*, 1957, **11**, 268.
- [12] HAGUENAU (F.), DALTON (A. J.) et MOLONEY (J. B.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1958, **20**, 633.
- [13] HARRIS (R. J. C.). *Brit. J. Cancer*, 1954, **8**, 731.
- [14] KEOGH (E. V.). *Brit. J. exp. Path.*, 1938, **19**, 1.
- [15] MILFORD (J. J.) et DURAN-REYNALS (F.). *Cancer Res.*, 1943, **3**, 578.
- [16] MOLONEY (J. B.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1956, **16**, 877.
- [17] MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.) et PARKER (R. C.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1950, **73**, 1.
- [18] PRINCE (A. M.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1958, **20**, 147.
- [19] PRINCE (A. M.). *Virology*, 1958, **5**, 435.
- [20] PRINCE (A. M.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1959, **23**, 1361.
- [21] PRINCE (A. M.). *Virology*, 1960, **11**, 371 et 400.
- [22] RUBIN (H.). *Virology*, 1955, **1**, 445.
- [23] RUBIN (H.). *Virology*, 1960, **10**, 29.
- [24] VIGIER (P.). *Virology*, 1959, **8**, 41.
- [25] VIGIER (P.) et GOLDE (A.). *Virology*, 1959, **8**, 60.
- [26] ROUS (P.) et MURPHY (J. B.). *J. Am. Med. Assoc.*, 1911, **56**, 741.

LE CHAUFFAGE DES GERMES ET SON EFFET SUR LA MULTIPLICATION DU PHAGE PARTIELLEMENT INACTIVÉ PAR LE FORMOL

par J. HARMEGNIES, M. HAWARI (*) et W. MUTSAARS (**).

(Laboratoire de Bactériologie de l'Université libre de Bruxelles)

L'un de nous a signalé [1] l'amélioration du rendement en plages par le séjour à 42° des boîtes de Petri résultant des titrages du phage ϕ N partiellement inactivé par le formol. Le comportement du phage partiellement inactivé par le glyoxal est analogue [2].

Nous avons pu observer que l'effet des températures dépassant 38° s'obtient également en milieu liquide contenant les germes sensibles et le phage partiellement inactivé [2]. Ceci permet d'atteindre plus rapidement et avec plus de précision la température désirée en remplaçant l'étuve par un bain-marie muni d'un ultrathermostat réglable au 1/10 de degré et d'une pompe assurant un brassage énergique de l'eau.

TECHNIQUE.

Il a été utilisé un stock de phage ϕ N conservé à la glacière.

1° La formolisation du phage a été décrite [3].

2° Il en est de même pour le traitement par le glyoxal [2].

3° L'inactivation partielle du phage par l'acroléine s'obtient par mélange de 0,5 ml d'une dilution à 5.10^{-4} d'acroléine et de 4,5 ml de phage non dilué. Le tube scellé renfermant ce mélange séjourne pendant vingt-six heures au bain-marie à 38°.

4° L'inactivation partielle par chauffage s'obtient par immersion d'un tube scellé contenant du phage non dilué dans un bain-marie à 64° pendant trente minutes.

5° L'irradiation par rayons ultra-violet se fait sur du phage non dilué, en couche mince, à raison de 23 ergs/mm²/sec⁻¹ pendant quarante-cinq secondes. Quel que soit le mode d'inactivation du phage, celui-ci est utilisé à la dilution de 10^{-2} .

La culture de coli W, âgée de 5 heures, résulte de l'ensemencement d'un ballon contenant 100 ml de bouillon (Brain Heart Infusion DIFCO)

(*) Boursier du Gouvernement syrien.

(**) Manuscrit reçu le 21 septembre 1960.

par une goutte de culture de 24 heures. Le développement se fait en condition de semi-anaérobiose. Dans certains cas il a été fait usage de cultures aérées par agitation et aussi de cultures plus âgées.

EXPÉRIENCE I. — 4 ml de phage partiellement inactivé par l'une des méthodes énumérées et dilué à 10^{-2} et 4 ml de culture de coli W sont introduits respectivement dans chacune des branches d'un dispositif permettant, par un mouvement de bascule, de réunir instantanément et de mélanger soigneusement les deux liquides au moment voulu. Ceux-ci peuvent ainsi être portés à la température désirée avant d'être mélangés. La durée de contact entre phage et germes est de cinq minutes, après quoi le mélange est titré en quintuple exemplaire. Nous avons ainsi soumis pendant cinq minutes des mélanges à l'action de températures croissantes par étapes de deux degrés, de 38° à 50° . De plus, deux essais ont été faits, l'un à la température du laboratoire (entre 18° et 22°), l'autre au bain de glace fondante (entre $0^{\circ}7$ et $1^{\circ}2$).

Les boîtes de Petri résultant des titrages séjournent une nuit à l'étuve à 38° .

Il est fait une numération du phage normal et une numération de la culture de *Coli* W, ce qui permet de calculer le quotient phages (nombre total de particules inactivées ou non)/germes. Ce quotient a toujours été inférieur à 0,3. Les infections multiples sont par conséquent négligeables, même en admettant une fixation totale du phage sur les germes.

Afin de rendre les résultats comparables, ceux-ci ont été calculés en ramenant le titre des essais à 38° à la valeur arbitraire de 100 plages, les autres titres étant exprimés en fonction de cette modification. Le tableau I comprend les résultats d'expériences faites avec du phage traité, selon le cas, par le formol ou le glyoxal, ainsi qu'avec du phage partiellement inactivé par la chaleur ou les radiations ultra-violettes. Seul le traitement du phage par un aldéhyde permet d'obtenir des mélanges phage-germes dont le chauffage augmente le rendement en plages. Les meilleurs résultats ont été obtenus au moyen de phage formolé, la réactivation maxima se situant à la température de 48° . Nous retrouvons de plus une réactivation, à vrai dire moins importante, pour les mélanges conservés à la température du laboratoire et à la glace fondante.

Les réactivations obtenues au moyen du phage glyoxalé ne sont pas aussi marquées. L'optimum se situe également à 48° , mais, à l'inverse du phage formolé, les températures inférieures à 38° sont défavorables au rendement.

Les traitements thermiques n'exercent aucune influence sur les mélanges renfermant du phage inactivé par la chaleur ou les rayons ultra-violettes.

TABLEAU I. — Expérience I. — Mélanges germes-phage partiellement inactivé maintenus cinq minutes à la température indiquée.

	GLACE	LABO- RATOIRE	38°	40°	42°	44°	46°	48°	50°
A. Phage traité par le for- mol	385 ± 9 %	259 ± 20 %	100 ± 4 %	182 ± 16 %	378 ± 25 %	980 ± 4 %	1 390 ± 8 %	8 195 ± 2 %	2 048 ± 17 %
B. Phage traité par le gly- oxal	57 ± 16 %	66 ± 22 %	100 ± 19 %	390 ± 13 %	710 ± 13 %	446 ± 16 %	836 ± 10 %	3 450 ± 12 %	877 ± 21 %
C. Phage traité par la cha- leur	92 ± 13 %	100 ± 7,7 %	100 ± 4 %	98 ± 4 %	93 ± 8,2 %	106 ± 7,8 %	95 ± 8,5 %	95 ± 6,7 %	37 ± 14,8 %
D. Phage traité par les U-V	100 ± 9 %	98 ± 7 %	100 ± 6,4 %	112 ± 6,6 %	106 ± 8 %	93 ± 12 %	47 ± 6 %	6 ± 27 %	0 —

TABLEAU II. — Expérience II. — Germes (culture âgée de 5 heures) maintenus cinq minutes à la température indiquée. Le contact ultérieur germes-phage partiellement inactivé se fait à 38°.

	GLACE	LABO- RATOIRE	38°	40°	42°	44°	46°	48°	50°
A. Phage traité par le for- mol	98 ± 16 %	112 ± 17 %	100 ± 13 %	128 ± 8 %	126 ± 13 %	393 ± 15 %	558 ± 8 %	1 740 ± 3,3 %	4 605 ± 10 %
B. Phage traité par le gly- oxal	62 ± 17 %	77 ± 14 %	100 ± 25 %	103 ± 17 %	133 ± 25 %	241 ± 4 %	212 ± 6,8 %	397 ± 5 %	1 119 ± 18 %
C. Phage traité par l'acro- léine	—	—	100 ± 5 %	112 ± 6,8 %	157 ± 6,2 %	218 ± 6,4 %	227 ± 5 %	657 ± 7 %	659 ± 2,3 %

EXPÉRIENCE II. — Il n'est point nécessaire, pour obtenir l'effet décrit, de chauffer les mélanges de germes et de phages partiellement inactivés, il suffit de chauffer préalablement les germes.

Il a été fait usage, selon le cas, de phage traité par le formol, le glyoxal ou l'acroléine. Comme dans l'expérience précédente, on introduit dans une des branches du dispositif, 4 ml de phage partiellement inactivé et dilué à 10^{-2} , dans l'autre, 4 ml d'une culture de *coli* W. Seule la branche contenant les germes est immergée dans le thermostat pendant cinq minutes, la branche contenant le phage étant à ce moment à la température du laboratoire. Après le traitement thermique, la branche contenant les germes est rapidement refroidie sous un jet d'eau, après quoi, le dispositif est immergé sans tarder dans un bain-marie à 38°, jusqu'à atteinte de l'équilibre thermique. A ce moment, phage et germes sont mélangés. La fixation se fait donc à 38°, quelle que soit la température à laquelle les germes aient été préalablement soumis. Le tableau II indique que le traitement thermique des germes précédant la fixation du phage inactivé améliore le rendement en plages. Cette amélioration, bien que nette avec les phages traités par le glyoxal ou l'acroléine, est surtout marquée quand on utilise du phage traité par le formol. La réactivation observée dans les mélanges de germes et de phage formolé maintenus à basse température ne se retrouve cependant pas. Les germes soumis à la température de la glace fondante et mélangés à 38° à du phage formolé ne manifestent aucune augmentation du rendement.

Les deux processus, action des températures dépassant 38°, et action des températures inférieures à 38°, ont vraisemblablement des mécanismes différents.

EXPÉRIENCE III. — Les durées de chauffage que nous avons arbitrairement fixées à cinq minutes ne sont pas optima.

Une culture jeune de *coli* W est répartie dans une série de tubes qui sont ensuite immergés dans le thermostat à 48°. Après chaque intervalle de cinq minutes, un tube est retiré et aussitôt utilisé. L'expérience se prolonge pendant trente minutes ; nous disposons ainsi d'une gamme de germes ayant été soumis à 48° pendant des temps s'échelonnant entre zéro et trente minutes. Pour le reste, les expériences sont menées comme précédemment. Dès que le tube contenant les germes est retiré du thermostat, on introduit 4 ml de la culture dans une des branches du dispositif décrit, l'autre branche contenant 4 ml de phage formolé dilué à 10^{-2} . Ce dispositif est plongé dans un bain-marie à 38°. Dès que l'équilibre thermique est atteint, on opère le mélange, le titrage se faisant après cinq minutes.

Une numération des germes est faite : a) immédiatement avant le chauffage à 48° ; b) après trente minutes de séjour à 48°. Le chauffage à 48° détermine un rendement en plages qui atteint son maximum vers quinze minutes ; à partir de ce moment, existe un plateau. Le chauffage à 48° pendant trente minutes entraîne une diminution des germes capables de se multiplier. Pour cinq expériences, il n'atteint plus respectivement que 92 p. 100, 80 p. 100, 77 p. 100, 90 p. 100 et 35 p. 100 du total des germes viables non chauffés. Il est possible que cette diminution s'oppose à l'amélioration éventuelle du rendement en plages, ce qui expliquerait le plateau. L'augmentation du nombre de plages est la moins prononcée dans les expériences III et V ; ce sont celles où la diminution du nombre de germes viables est la plus accentuée.

Des expériences menées à 46° et à 44° ne présentent pas de plateau, le rendement en plages croît en fonction de la durée de chauffage. Ces expériences sont identiques à celles à 48°, seuls en différent les essais à 44°, dont les prélèvements sont faits de dix en dix minutes, la longueur maxima d'exposition à cette température étant de une heure (tableau III).

Les numérations de germes faites avant chauffage et après chauffage de trente minutes à 46° donnent, en pourcentage du total des germes viables non chauffés, les résultats suivants pour cinq expériences : 99 p. 100, 108 p. 100, 103 p. 100, 87 p. 100 et 126 p. 100. Les mêmes pourcentages pour les expériences menées à 44° (durée de chauffage de soixante minutes) sont de : 122 p. 100, 125 p. 100, 145 p. 100, 115 p. 100 et 156 p. 100.

EXPÉRIENCE IV. — Si la culture traitée est maintenue à 38° après son chauffage à 46° ou 48°, le rendement ultérieur en présence de phage formolé diminue progressivement. Cependant, dans les délais d'observation, ce rendement reste toujours très supérieur à celui de la culture non chauffée à 46° ou 48°.

Une jeune culture de *coli* W en bouillon est répartie dans une série de tubes qui sont ensuite immergés au thermostat à 48°. Après séjour de dix minutes à cette température, les tubes sont retirés et placés au bain-marie à 38°. Selon l'expérience, un tube est retiré toutes les cinq minutes (le dernier tube étant retiré après trente minutes), ou toutes les dix minutes (le dernier tube étant retiré après soixante minutes). Ces différents prélèvements sont mis en présence de phage formolé à mesure de leur sortie du bain-marie. Ces mélanges sont traités selon les modalités décrites. Un témoin est constitué par un prélèvement de la culture non chauffée, un autre par un prélèvement de culture chauffée, selon le cas, à 46° ou 48°, mais n'ayant pas séjourné à 38°. Des numérations de germes sont faites : a) de la culture non chauffée ; b) de la culture après séjour de dix minutes à 46° ou 48° ; c) de

TABLEAU III. — Expérience III. — Germes (culture âgée de 5 heures) maintenus à la température indiquée pendant les temps indiqués. Le contact ultérieur germes-phage formolé se fait à 38°.

	TÉMOIN COLI NON CHAUFFÉ	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min	NUMÉRATION GERMES $\times 10^8$ ml	
								non chauffés	30 min à T. ind.
A. Germes maintenus à 48°	100 $\pm 12,6$ %	6 285 ± 10 %	8 985 ± 8 %	9 710 $\pm 11,6$ %	8 190 $\pm 4,7$ %	9 715 $\pm 8,8$ %	9 160 $\pm 7,3$ %	7,5 $\pm 3,7$ %	6,9 $\pm 8,8$ %
B. Germes maintenus à 46°	100 ± 18 %	1 015 ± 4 %	2 295 ± 19 %	3 355 ± 19 %	3 655 ± 12 %	5 210 $\pm 5,8$ %	6 355 $\pm 6,5$ %	7,3 $\pm 3,5$ %	7,2 $\pm 5,5$ %
C. Germes maintenus à 44°	100 $\pm 11,8$ %	10 min 740 $\pm 4,7$ %	880 $\pm 8,6$ %	1 155 $\pm 6,8$ %	1 390 $\pm 5,6$ %	1 490 ± 17 %	1 850 ± 17 %	Non chauffés 7,4 ± 9 %	60 min à T° ind. 9 ± 7 %

TABLEAU IV. — Expérience IV. — Germes (culture de 5 heures) maintenus pendant dix minutes à la température indiquée puis à 38°, ou à la température de la glace fondante pendant les temps indiqués. Les mélanges germes-phage formolé se font à 38°.

	TÉMOIN GERMES NON CHAUFFÉS	0 min à 38°	5 min à 38°	10 min à 38°	15 min à 38°	20 min à 38°	25 min à 38°	30 min à 38°	NUMÉRATION GERMES $\times 10^8$ /ml		
									Coli NON CHAUFFÉ	Coli CHAUFFÉ à 38°	Coli CHAUFFÉ + 30 min à 38°
A. Germes maintenus à 48° puis à 38°	100 ± 17 %	6 300 ± 13 %	5 700 ± 13 %	4 485 ± 23 %	4 130 ± 8 %	3 710 $\pm 7,6$ %	3 410 $\pm 6,1$ %	3 985 ± 12 %	8,9 ± 3 %	7,6 ± 7 %	8,1 $\pm 5,8$ %
B. Germes maintenus à 46° puis à 38°	100 ± 20 %	1 870 $\pm 4,3$ %	400 ± 21 %	205 $\pm 4,4$ %	205 ± 9 %	265 ± 15 %	260 ± 20 %	360 ± 15 %	7,4 ± 5 %	7,2 $\pm 6,4$ %	10,3 $\pm 1,8$ %
C. Germes maintenus à 46° puis à T° glace fondante	100 ± 15 %	1 835 ± 19 %	1 760 ± 16 %	1 540 ± 11 %	1 565 ± 20 %	1 335 ± 16 %	1 455 ± 10 %	1 635 ± 22 %	6,9 $\pm 7,8$ %	6 $\pm 4,7$ %	6 $\pm 5,2$ %

la culture chauffée et ayant ensuite séjourné trente ou soixante minutes à 38°.

Si l'on prend comme critère le rendement en plages de la culture chauffée à 48° et mise aussitôt au contact du phage formolé, le rendement en plages des germes chauffés à 48° et ayant ensuite séjourné pendant trente minutes à 38° n'est plus que de 63 p. 100 ou 76 p. 100, selon l'expérience. Un séjour de soixante minutes donne un rendement de 40 p. 100.

Les expériences analogues faites avec des germes chauffés pendant dix minutes à 46°, avec séjour ultérieur maximum de soixante minutes à 38°, n'ont plus en rendement que 62 p. 100, 19 p. 100, 40 p. 100 et 33 p. 100 de celui des germes chauffés ne séjournant pas à 38°.

Cette tendance au retour à la normale des germes chauffés est freinée, comme on pouvait s'y attendre, si l'on remplace le séjour à 38° par un séjour dans de la glace fondante. Ces essais ont été faits en utilisant des germes traités par chauffage à 46° pendant dix minutes. Le rendement, après soixante minutes de séjour à la glace fondante, est de 121 p. 100, 89 p. 100 et 84 p. 100 de celui des germes testés immédiatement après chauffage à 46°.

EXPÉRIENCE V. — La réaction au chauffage des cultures vieilles est nettement moins intense. Au cours des premiers essais, nous avons utilisé des cultures âgées de 29 heures, en bouillon B. H. I., réparti à raison de 100 ml dans des ballons de ce volume. Les germes s'y trouvent donc dans des conditions de semi-anaérobiose. Pour les essais de 40° à 50°, les germes ont été chauffés séparément au thermostat, les mélanges de germes et de phage formolé se faisant ensuite au bain-marie à 38°. Les essais à la température de la glace fondante se font en mélangeant germes et phage préalablement portés à cette température. L'essai à 38° sert de point de référence. A part les essais à la glace fondante, la technique est donc identique à celle de l'expérience II.

L'effet maximum s'observe toujours à 48°, mais les rendements sont inférieurs à ce que l'on obtient avec une culture jeune. De plus, à la température de la glace fondante, le rendement est

TABLEAU V. — Expérience V. — Germes (culture de 29 heures) maintenus cinq minutes à la température indiquée. Les mélanges germes-phage se font à 38° sauf pour l'essai à la glace fondante qui se fait à cette température.

GLACE FONDANTE	38°	40°	42°	44°	46°	48°	50°
49 ± 4,8 %	100 ± 5,2 %	99 ± 7,5 %	102 ± 6,2 %	131 ± 6,3 %	202 ± 13 %	239 ± 7,3 %	247 ± 6,5 %

nettement diminué par rapport au rendement de base de 38°, alors que, en utilisant une culture jeune, ce rendement était dans les mêmes conditions doublé (voir tableau I). Ceci plaide en faveur de la non-identité des mécanismes activateurs aux températures au-dessus et en dessous de 38° (tableau V).

EXPÉRIENCE VI. — L'expérience précédente nous a déjà démontré que l'état physiologique du germe mis en présence du bactériophage formolé influe considérablement sur le rendement du traitement thermique. Au cours des essais suivants, nous avons utilisé : *a*) une culture en ballon (semi-anaérobiose) âgée de 5 heures ; *b*) une culture en couche mince (flacon de Roux) âgée de 5 heures, agitée à l'étuve par une machine à secouer ; *c*) analogue à *a*) mais âgée de 29 heures ; *d*) analogue à *b*) mais âgée de 29 heures.

Des prélèvements de ces quatre types de culture sont mis en présence, d'une part, de phage formolé (dilution 10^{-2}), d'autre part, de phage normal (dilution 10^{-6}). Les constituants phage et germes des mélanges sont portés à la température de 38° et la fixation se fait également à cette température. Le traitement thermique n'est donc pas appliqué au cours de cette expérience (tableau VI).

TABLEAU VI. — Expérience VI. — Mélanges germes-phage à 38°.

	PHAGE FORMOLÉ (dil. 10^{-2})	PHAGE NORMAL (dil. 10^{-6})
A. Culture 5 h semi-anaérobiose	100 ± 16 %	100 ± 9,1 %
B. Culture 5 h aérobiose	48 ± 28 %	90 ± 18 %
C. Culture 29 h semi-anaérobiose	800 ± 4,3 %	90 ± 5,6 %
D. Culture 29 h aérobiose	70 ± 20 %	6,6 ± 36 %

En présence de phage formolé, le rendement maximum est obtenu avec des germes âgés en condition de semi-anaérobiose (les résultats obtenus au moyen de la culture jeune en semi-anaérobiose étant pris pour base). Quel que soit l'âge de la culture, l'aérobiose est défavorable au rendement. En présence de phage normal, il n'existe pas de différences marquées de rendement, exception faite pour la culture âgée en aérobiose, dont l'influence est défavorable.

EXPÉRIENCE VII. — Rouyer et Latarjet [4] ont montré que des germes « tués » par les rayons X permettaient la multiplication du phage. Anderson [5], utilisant des germes « tués » par les radiations ultra-violettes, a fait les mêmes constatations. Des germes « tués » par les rayons ultra-violettes réagissent-ils encore au chauffage?

Une culture de *coli* W, âgée de 5 heures, est centrifugée et lavée deux fois à l'eau physiologique. La centrifugation se fait dans une enceinte réfrigérée, de façon à éviter tout réchauffement intempestif des germes. Après remise en suspension dans un volume égal au volume primitif, les germes sont irradiés en couche mince (10 ml de suspension dans une grande boîte de Petri) avec une intensité de $20 \text{ ergs/mm}^2/\text{sec}^{-1}$ pendant quatre-vingt-dix secondes. On irradie ainsi plusieurs lots qui sont réunis et utilisés pour réaliser une expérience identique pour le reste à celle du tableau V ; les germes irradiés sont soumis pendant cinq minutes aux températures indiquées. Les mélanges phage formolé-germes irradiés chauffés séjournent pendant cinq minutes à 38° avant le titrage. Il va sans dire que toutes ces opérations se déroulent à l'abri de la lumière du jour dans un laboratoire éclairé par une lampe rouge de photographie. Un essai est également fait à la température de la glace fondante, le contact entre germes irradiés et phage formolé se fait à cette même température.

Il est nécessaire, au moment du titrage, d'incorporer à la gélose molle 0,5 ml de *coli* W non irradié, non chauffé, ceci pour former un gazon microbien permettant la mise en évidence des plages. Ce *coli* ne participe pas à la fixation du phage formolé (tableau VII).

TABLEAU VII. — Expérience VII. — Coli (culture de 5 heures) irradié quatre-vingt-dix secondes puis maintenu cinq minutes aux températures indiquées. Les mélanges germes irradiés-phage formolé se font à 38° , sauf pour l'essai à la glace fondante qui se fait à cette température.

0°	38°	40°	42°	44°	46°	48°	50°	NUMÉRATION DES GERMES	
								Coli non irradié $\times 10^8/\text{ml}$	Coli irradié $\times 10^4$
270 $\pm 15 \%$	100 $\pm 2,5 \%$	157 $\pm 10 \%$	220 $\pm 6 \%$	342 $\pm 11 \%$	612 $\pm 5 \%$	1 755 $\pm 12 \%$	710 $\pm 11 \%$	9 $\pm 4 \%$	11,8 $\pm 11 \%$

Chaque essai s'accompagne d'une numération des germes avant et après irradiation. Sous l'effet de celle-ci, le nombre de germes viables est réduit de 10^3 à 10^4 fois. Tant au point de vue chauffage

que refroidissement, les germes irradiés se comportent comme des germes normaux. Le minimum de rendement en plages s'observe à 38°, le maximum à 48°.

EXPÉRIENCE VIII. — Cependant, une irradiation plus sévère supprime l'effet thermique. Lavons et remettons en suspension comme précédemment une culture de *coli* W âgée de 5 heures. Une fraction de cette suspension en eau physiologique est utilisée telle quelle à titre de témoin (*coli* non irradié), le reste de la suspension est divisé en trois autres fractions qui seront irradiées avec la même intensité que précédemment, mais respectivement pendant une, trois et cinq minutes. Chacune des quatre fractions est ensuite divisée en deux lots : a) germes utilisés tels quels ; b) germes portés pendant dix minutes à 46°. Finalement, les huit lots sont mis en présence de phage formolé, cette opération se faisant à 38° et étant suivie du titrage ; pour les raisons exposées plus haut, on incorpore à ce moment du *coli* W non irradié, non chauffé. Les résultats sont exposés au tableau VIII.

On a ramené à la base 100, le nombre de plages fourni par les mélanges de phage formolé et de *coli* non irradié et non chauffé, les autres chiffres étant modifiés proportionnellement.

L'examen des séries comportant des germes non chauffés indique qu'une irradiation même prolongée n'abolit pas la capacité du germe de produire du phage ; la moyenne globale de la chute de production de plages pour les germes irradiés pendant cinq minutes n'est que de 25 p. 100 par rapport aux germes non irradiés.

Examinons à présent l'effet des irradiations précédant le traitement thermique. L'irradiation d'une minute, loin de diminuer le rendement en plages déterminé par le chauffage ultérieur, tend à l'augmenter. Ce rendement dépasse en effet régulièrement celui des germes témoins non irradiés et chauffés. Les irradiations plus prolongées suppriment au contraire toute amélioration du rendement par traitement thermique. Le nombre de plages après traitement thermique de ces germes irradiés est même légèrement inférieur à celui des témoins correspondants non chauffés.

Il a été fait une série d'expériences ne différant des précédentes que par l'inversion des traitements : les germes sont d'abord maintenus pendant dix minutes à 46° dans l'ultrathermostat, puis irradiés pendant une, trois ou cinq minutes. A ces séries correspondent des témoins irradiés, mais non chauffés. Enfin, deux séries sont constituées respectivement au moyen de germes non irradiés et non chauffés, et au moyen de germes non irradiés mais chauffés. De plus, il est fait un titrage du *coli* W utilisé, d'une part, à l'état de germes non irradiés et non chauffés, d'autre part, à l'état de germes irradiés cinq minutes et non chauffés. Ces

TABLEAU VIII. — Expérience VIII. — Germes (culture de 5 heures) irradiés pendant les temps indiqués.

	GERMES NON IRRADIÉS	GERMES IRRADIÉS 1 min	GERMES IRRADIÉS 3 min	GERMES IRRADIÉS 5 min	NUMÉRATION DES GERMES	
					Non irradiés $\times 10^8$ /ml	Irradiés 5 min $\times 10^2$
I. A. Germes non chauffés.	100 ± 11 %	87 ± 16 %	108 ± 25 %	69 ± 15 %		
B. Germes chauffés 10 min à 46° après irradiation	550 ± 8 %	677 ± 8 %	60 ± 19 %	50 ± 20 %		
II. A. Germes non chauffés.	100 ± 9 %	184 ± 10 %	89 ± 10 %	63 ± 18 %	4,2 $\pm 2,7$ %	5,4 ± 10 %
B. Germes chauffés 10 min à 46° avant irradiation	1 028 $\pm 4,4$ %	747 $\pm 3,5$ %	464 ± 14 %	305 $\pm 9,2$ %		

TABLEAU IX. — Expérience IX. — Germes (culture de 5 heures) irradiés pendant le temps indiqué, puis chauffés dix minutes à 46°, enfin placés à 38° pendant le temps indiqué.

Germes irr. 2 min.	NUMÉRATION DES GERMES							
	<i>Coli</i> IRRAD. NON CHAUFFÉ	<i>Coli</i> IRRAD. CHAUFFÉ 0 min à 38°	<i>Coli</i> IRRAD. CHAUFFÉ 10 min à 38°	<i>Coli</i> IRRAD. CHAUFFÉ 20 min à 38°	<i>Coli</i> IRRAD. CHAUFFÉ 30 min à 38°	<i>Coli</i> IRRAD. CHAUFFÉ 40 min à 38°	<i>Coli</i> IRRAD. CHAUFFÉ 50 min à 38°	<i>Coli</i> IRRAD. CHAUFFÉ 60 min à 38°
	100 ± 10 %	660 ± 12 %	390 ± 10 %	275 ± 14 %	175 ± 13 %	108 ± 9 %	81 ± 26 %	71 ± 14 %

derniers titrages indiquent que le nombre de germes viables, sous l'effet de cette irradiation prolongée, est diminué d'un facteur égal à environ 10^6 .

Il résulte de ces essais que les irradiations prolongées postérieures au chauffage à 46° , tout en diminuant par rapport au témoin non irradié le rendement thermique, ne suppriment pas celui-ci. Le résultat de l'irradiation prolongée dépend donc nettement du moment de son application par rapport au chauffage.

De toute façon, il résulte de ces expériences que la capacité de réagir à l'effet thermique par un rendement accru du nombre de plages est plus sensible à l'action des radiations ultra-violettes que la capacité de synthétiser du phage.

Rappelons que Jacob, Torriani et Monod [6] ont constaté que la capacité de synthétiser la β -galactosidase disparaît également avant celle de synthétiser du phage.

EXPÉRIENCE IX. — Nous avons vu (Exp. VII et VIII) qu'une irradiation modérée des germes ne supprime pas leur réaction au chauffage. L'expérience IV nous a montré que l'effet thermique sur les germes non irradiés s'atténue progressivement par le maintien à 38° et en milieu nutritif de la culture traitée, sans que, dans les délais d'observation de soixante minutes, le rendement en plages redescende au niveau de celui de la culture-témoin non chauffée.

L'irradiation modérée des germes préalablement au chauffage, suivie du maintien à 38° et en milieu nutritif, détermine au contraire une chute rapide du rendement qui atteint et devient souvent inférieur à celui des germes témoins irradiés et non chauffés.

Une culture de *coli* W âgée de 5 heures est centrifugée à froid, lavée et remise en suspension en eau physiologique. Les précautions habituelles pour se préserver de la lumière visible étant prises, on irradie plusieurs lots de 10 ml de cette suspension (durée de deux ou deux minutes 30 secondes, selon le cas). Les fractions étant réunies, on ajoute une quantité égale de bouillon. Cette suspension est ensuite répartie en une série de tubes qui sont maintenus à 46° pendant dix minutes, un tube étant cependant réservé à titre de témoin (germes irradiés non chauffés). Les tubes ayant subi le traitement thermique sont ensuite disposés dans un bain-marie à 38° . Un tube est retiré toutes les dix minutes, le dernier après soixante minutes. Un tube témoin est constitué de germes irradiés, chauffés à 46° mais n'ayant pas séjourné à 38° . Dès leur prélèvement, les germes sont mis en présence de phage formolé et les mélanges sont titrés.

Les numérations suivantes de germes viables sont faites : a) suspension de germes non traités ; b) suspension de germes

irradiés (deux minutes ou deux minutes trente secondes, selon le cas) ; c) suspension de germes irradiés, maintenus à 46° pendant dix minutes à l'obscurité ; d) suspension de germes irradiés, chauffés et ayant séjourné soixante minutes à 38°.

Ces essais montrent que le rendement thermique des germes irradiés pendant deux minutes trente est inférieur à celui des germes irradiés pendant deux minutes. Ceci n'a rien d'anormal, puisqu'une irradiation d'une durée de trois minutes supprime tout effet thermique (Exp. VIII). D'autre part, le rendement en plaques dû à l'effet thermique décroît rapidement quand les germes irradiés et chauffés sont maintenus en milieu nutritif à 38°. Ce rendement devient, dans la plupart des cas, inférieur à celui des germes irradiés non chauffés. Enfin, les numérations de germes (série b et c) faites sur les suspensions irradiées et sur les suspensions irradiées maintenues à 46° pendant dix minutes, montrent une nette augmentation, due au chauffage, du nombre de germes viables (tableau IX).

Pour 100 colonies obtenues avec les suspensions de germes irradiés, le nombre de colonies donné par les suspensions de germes irradiés et chauffés est, dans l'ordre des expériences, de 230, 282, 227, 358 et 347. Un chauffage en milieu liquide à l'obscurité, d'une durée de dix minutes, permet donc de réactiver des germes irradiés. Notons que Stein et coll. [7] ont obtenu une réactivation thermique du *coli* B irradié en incubant les boîtes de Petri résultant des titrages à des températures de 44°. Ces auteurs avaient noté que l'effet réactivateur de la température se produisait dans les quatre premières heures de l'incubation.

EXPÉRIENCE X. — L'addition de chloramphénicol aux cultures, préalablement à leur chauffage, diminue le rendement ultérieur en plaques.

Une culture de *coli* W âgée de 5 heures est divisée en 4 lots de 18 ml, recevant respectivement 2 ml d'eau physiologique, 2 ml d'une solution à 100 µg de chloramphénicol, 2 ml d'une solution à 200 µg ou 2 ml d'une solution à 400 µg de chloramphénicol/ml. Le taux du chloramphénicol dans les suspensions est donc respectivement de 10, 20 ou 40 µg/ml. Chacun des lots est ensuite subdivisé en deux fractions, la première étant utilisée telle quelle, la seconde étant maintenue pendant dix minutes à 46°. Les huit fractions ainsi obtenues sont utilisées pour la constitution de mélanges germes-phage formolé, à raison de 4 ml de germes et de 4 ml de phage formolé dilué à 10⁻². Au cours de la période de contact à 38°, le taux du chloramphénicol est donc respectivement de 5, 10 et 20 µg/ml. Le titrage comportant le prélèvement de 0,9 ml que l'on introduit dans 5 ml de

gélose à 0,6 p. 100, le chloramphénicol est à ce moment aux dilutions de 1, 2 et 4 $\mu\text{g/ml}$. Finalement, le chloramphénicol se diluera encore par diffusion dans la gélose de base qu'utilise la technique de Gratia.

Le présence des faibles quantités de l'antibiotique ne modifie guère le rendement en plages des germes non chauffés. La présence de chloramphénicol en quantités relativement fortes au moment du chauffage des germes diminue au contraire nettement le rendement ultérieur en plages, sans que cette diminution soit proportionnelle aux quantités d'antibiotique mises en jeu (tableau X).

TABLEAU X. — Expérience X. — Germes (culture âgée de 5 heures), le chauffage se fait pendant dix minutes à 46° en présence des quantités de chloramphénicol indiquées. Les mélanges germes-phage formolé se font à 38° .

	SANS CHLORAM- PHÉNICOL	10 μg CHLORAM- PHÉNICOL	20 μg CHLORAM- PHÉNICOL	40 μg CHLORAM- PHÉNICOL
A. Germes non chauffés	100 $\pm 17 \%$	105 $\pm 12 \%$	101 $\pm 11 \%$	88 $\pm 25 \%$
B. Germes chauffés 10 min à 46°	1165 $\pm 4,4 \%$	705 $\pm 9 \%$	610 $\pm 6,7 \%$	520 $\pm 9,6 \%$

EXPÉRIENCE XI. — Au cours de tous les essais précédents, il a été fait usage, soit de germes traités par la chaleur avant leur mise en présence du phage formolé, le titrage se faisant après cinq minutes de contact à 38° , soit de mélanges de germes et de phage formolé, le titrage se faisant après cinq minutes de contact à la température indiquée. Le traitement thermique précédait donc la fixation du phage formolé, ou coïncidait avec elle et avec les premiers stades de développement du phage.

Nous avons voulu observer l'effet d'un traitement thermique de plus en plus tardif par rapport au contact des germes et du phage.

Nous avons procédé comme suit :

On constitue 4 séries de mélanges, les germes provenant d'une culture âgée de cinq heures et le phage formolé étant dilué à 10^{-2} . La série A est chauffée à 48° pendant cinq minutes, puis séjourne quinze minutes au bain-marie à 38° , le tout suivi du titrage. Cette série subit donc son traitement thermique pendant le premier quart. La série B subit son traitement à 48° pendant le deuxième quart, les cinq premières minutes ainsi que les

dernières dix minutes se passant à 38°; la série C subit de même son traitement thermique pendant le troisième quart, et la série D pendant le dernier quart, après quinze minutes de contact à 38°.

Une série témoin est constituée par un mélange analogue aux précédents mais ne subissant aucun traitement thermique et séjournant par conséquent à 38° pendant vingt minutes.

Constatons qu'en général, l'efficacité du traitement thermique dépend du moment de son application, le traitement le plus précoce donnant le rendement en phages le plus élevé. Cependant, le chauffage le plus tardif est loin d'être inactif (tableau XI).

TABLEAU XI. — Expérience XI. — Germes (culture âgée de 5 heures), mélange germes-phage formolé à 38°, chauffage à 48° pendant cinq minutes.

CONTACT GERMES PHAGE FORMOLÉ 20 min à 38°	CONTACT GERMES- PHAGE FORMOLÉ a) 5 min à 48° b) 15 min à 38°	CONTACT GERMES- PHAGE FORMOLÉ a) 5 min à 38° b) 5 min à 48° c) 10 min à 38°	CONTACT GERMES- PHAGE FORMOLÉ a) 10 min à 38° b) 5 min à 48° c) 5 min à 38°	CONTACT GERMES- PHAGE FORMOLÉ a) 15 min à 38° b) 5 min à 48°
100 ± 16 %	4 150 ± 10 %	3 010 ± 4,8 %	2 110 ± 3,5 %	1 690 ± 6 %

DISCUSSION.

Le traitement thermique agit exclusivement sur le germe. Envisageant les différentes phases de la reproduction du bactériophage, ce traitement pourrait favoriser, par une modification de la surface microbienne, l'adsorption des particules formolées. Ceci paraît cependant peu vraisemblable; nous avons en effet observé antérieurement [4] que l'incubation à 42° des boîtes de Petri résultant des titrages des mélanges de germes et de phage formolé augmentait le rendement en phages par rapport à l'incubation à la température normale de 38°. A partir du moment où les germes, le phage formolé et les complexes germes-phage sont inclus dans la gélose à 0,6 p. 100, toute possibilité de nouvelle fixation doit être largement exclue. L'effet thermique n'agit donc pas sur la phase de fixation.

L'influence du chauffage pourrait s'exercer soit en facilitant la pénétration du matériel phagique formolé, soit en intervenant au cours du développement ultérieur. Les essais faits en faisant varier le moment d'application du chauffage au cours des vingt premières minutes de l'existence du mélange germes-phage formolé ne permettent cependant pas de se former une opinion à

ce sujet. Le chauffage est efficace tout au long de ce délai, bien que le rendement diminue en fonction du retard apporté à son application.

Les expériences décrites ne permettent pas non plus d'élucider le mode d'action du traitement thermique.

Il est certain que la température optima de 48° de l'effet thermique est déjà létale pour un certain nombre de germes, les numérations de germes en font foi. On pourrait donc admettre, à mesure que l'on se rapproche de l'optimum, une diminution croissante de la vitalité microbienne, ce qui pourrait entraîner une tolérance croissante du matériel phagique formolé, le germe normal étant au contraire résistant à l'infection par ce matériel plus ou moins atténué.

Cette diminution croissante de la vitalité microbienne s'accompagne vraisemblablement de la destruction progressive des systèmes enzymatiques. Si un germe normal n'oppose aucune résistance au matériel phagique normal injecté (phage virulent), on sait que, dans les cas de surinfection, l'acide désoxyribonucléique surinfectant est détruit, cette destruction étant d'autant plus complète que le délai entre la primo et la surinfection est plus long (Graham [8]).

Le matériel phagique formolé, plus lent à déclencher le cycle reproductif du phage, serait par conséquent plus exposé à l'action de la désoxyribonucléase. Le chauffage détruirait ou inhiberait cette enzyme, permettant ainsi au matériel phagique formolé d'entamer sa reproduction.

Le séjour à 38° des germes chauffés permettrait la reconstitution d'un nouveau stock d'enzyme, et par conséquent la disparition progressive de l'effet thermique.

Cependant les résultats des irradiations par les rayons ultraviolets ne sont pas favorables à cette hypothèse. Une irradiation suffisamment prolongée supprime tout effet d'un chauffage ultérieur ; or, l'irradiation, frappant surtout la chromatine, devrait accentuer la réceptivité de la cellule microbienne au matériel phagique formolé. Une telle cellule, après chauffage, serait non seulement privée de l'enzyme, mais également de l'appareil de synthèse de cette enzyme. De même, la disparition de l'effet thermique est bien plus rapide et complète dans le cas des germes modérément irradiés et ensuite chauffés que dans le cas des germes simplement chauffés.

Les germes irradiés sont dans une certaine mesure réactivés par le chauffage (Exp. IX), ce qui n'est pas favorable à l'hypothèse envisagée. Enfin cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la spécificité de l'action de la chaleur. Les résultats positifs du chauffage ont été obtenus en utilisant du phage partiellement inactivé par une aldéhyde : formaldéhyde, glyoxal, acroléine. Le

phage partiellement inactivé par l'isocyanate de phényle, le sublimé, l'ypérite à l'azote, donne des résultats négatifs, de même que le phage partiellement inactivé par le chauffage ou les rayons ultra-violets.

CONCLUSIONS.

1° Le chauffage des mélanges d'*E. coli* W et du phage ϕ N formolé correspondant augmente le rendement en complexes productifs de phages.

2° Le même effet s'obtient par chauffage des germes isolés, avant leur contact avec le phage formolé.

3° Le rendement en complexes productifs croît avec l'élévation de la température, l'optimum se situant à 48°, ceci pour une durée de chauffage de cinq minutes.

4° L'effet ne s'obtient que par utilisation de phage partiellement inactivé par une aldéhyde : formaldéhyde, glyoxal, acroléine. L'utilisation de phage partiellement inactivé par le chauffage ou les rayons ultra-violets, ne donne que des résultats négatifs.

5° Le séjour des germes traités dans un milieu nutritif et à 38° leur fait perdre progressivement leur aptitude à former des complexes productifs ; cette perte est moins accentuée à la température de la glace fondante.

6° L'effet thermique est supprimé par une irradiation intense et préalable des germes par les ultra-violets ; il est diminué par la présence, au moment du chauffage, de chloramphénicol.

7° En dehors de tout effet thermique, le rendement en complexes productifs des mélanges de germes et de phage formolé dépend de l'état physiologique du germe, les cultures âgées et en semi-anaéorobiose donnant le meilleur rendement.

SUMMARY.

THE HEATING OF THE GERMS AND ITS EFFECT ON THE MULTIPLICATION OF THE PHAGE PARTIALLY INACTIVATED BY FORMALDEHYDE.

1° Heat treatment of mixtures of *coli* W and corresponding phage partially inactivated by formaldehyde insures an increase in the number of productive complexes.

2° Heat treatment of the host cells, prior to the addition of the phage partially inactivated by formaldehyde, insures the same result.

3° The increase in productive complexes is a function of the temperature, an optimum being reached at 48° (duration of heating : five minutes).

4° The heat treatment effect can only be obtained through the use of phage partially inactivated by an aldehyde : formaldehyde, glyoxal and acrolein were tested. Negative results were obtained with phage partially inactivated by mercury chloride (corrosive sublimate), phenylisocyanide or nitrogen mustard, and with phage partially inactivated by heating or ultra-violet radiation.

5° The effect of the heat treatment on the cells is not permanent, it tends to diminish if the heat treated cells are incubated in a nutrient medium at 38°.

6° Intensive irradiation by ultra-violet rays of the cells suppresses the effect of ulterior heat treatment.

7° The heat treatment effect is partially inhibited by chloramphenicol.

8° The number of productive complexes, using formaldehyde inactivated phage, depends on the physiological state of the germs, the largest increase in productive complexes being obtained with germs from an old (29 hours) semi-anaerobic culture. No heat treatment was used for these experiments.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MUTSAARS (W.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 93.
 - [2] MUTSAARS (W.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 119.
 - [3] MUTSAARS (W.). *Ann. Inst. Pasteur* 1957, **92**, 1.
 - [4] ROUYER (M.) et LATARJET (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 89.
 - [5] ANDERSON (T. F.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 411.
 - [6] JACOB (F.), TORRIANI et MONOD (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1230.
 - [7] STEIN (W.). *Naturwiss.*, 1950, **37**, 176 ; 1952, **39** 113.
 - [8] GRAHAM (A. F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 90.
-

FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES ET POUVOIR PROTECTEUR DU SÉRUM DU RAT BLANC IMMUNISÉ CONTRE *PLASMODIUM BERGHEI*

par M^{me} C. CAUSSE-VAILLS, M^{lle} J. ORFILA et M. G. FABIANI (*).

(Laboratoires de Physique médicale et de Bactériologie,
Faculté de Médecine d'Alger)

Le sérum d'animaux immunisés contre une infection plasmodiale s'oppose avec une plus ou moins grande efficacité au développement du paludisme chez des animaux neufs [1, 2]. Bien qu'il ne soit pas démontré que ce pouvoir séro-protecteur soit dû à un anticorps, il nous a paru intéressant de rechercher si, comme les anticorps classiques, cette propriété immunologique est liée à une fraction protéique bien définie du sérum. La technique d'électrophorèse à flux continu nous a paru convenir à la solution de ce problème. Nous étudierons successivement la technique employée et les résultats obtenus, en recourant comme matériel d'étude au sérum du rat blanc immunisé contre *Plasmodium berghei*.

I. — TECHNIQUE.

A. — SÉPARATION DES DIFFÉRENTES FRACTIONS PAR ÉLECTROPHORÈSE CONTINUE.

L'électrophorèse continue a été proposée par Haugaard et Kroner (1948), puis par Svensson (1950) et Grassmann (1949-1950). Grâce à ce nouveau mode de séparation, il est possible d'isoler les différents constituants protéiques du sérum, alors que l'électrophorèse en veine liquide ne permet de recueillir que les fractions « de tête et de queue ».

Le principe en est maintenant classique : le sérum amené de façon continue sur une feuille de papier filtre humide est entraîné par un flux descendant de tampon et soumis d'autre part à un champ électrique transversal. Les protéines sollicitées par deux

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 octobre 1960.

forces rectangulaires suivent une trajectoire plus ou moins oblique selon leur charge et leur mobilité.

La technique que nous utilisons est inspirée de celle proposée par Durrum [3] à laquelle nous avons apporté quelques modifications rendues nécessaires par les conditions du problème qui nous occupe.

DESCRIPTION DE L'APPAREIL. — L'appareil construit en plexi-glas est symétrique et permet de conduire simultanément deux séparations (fig. 1). Il est essentiellement constitué d'une chambre

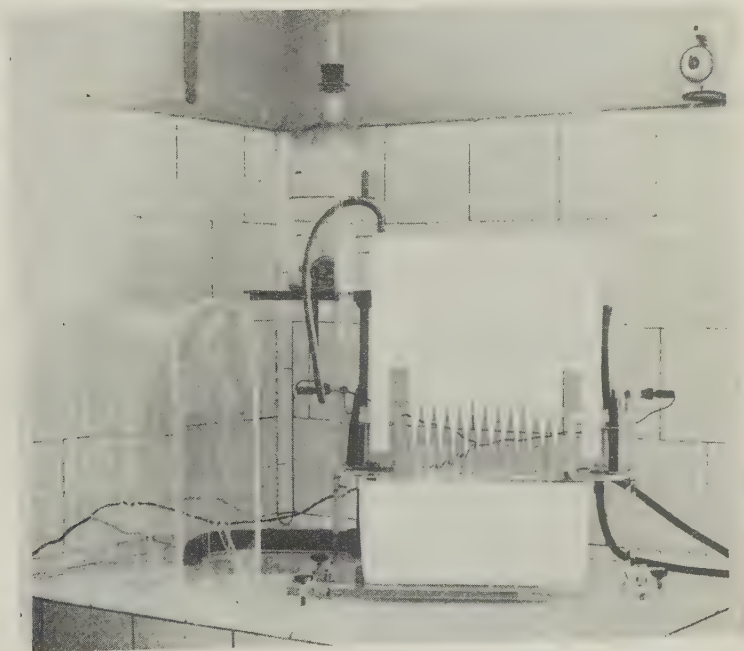


FIG. 1. — Photographie de l'appareil à électrophorèse continue.

humide verticale comportant à la partie supérieure un réservoir d'électrolyte dans lequel plongent les deux feuilles de papier filtre.

Il convient d'utiliser un papier de texture homogène et d'épaisseur appropriée au problème envisagé. Avec un papier épais l'écoulement est rapide et la séparation médiocre, mais la quantité de liquide recueilli est relativement importante, ce qui n'est pas le cas d'un papier plus mince dans lequel l'écoulement est

lent, mais qui, par contre, permet une séparation plus fine. Des essais successifs de différentes qualités de papier (en particulier Whatman n° 2 et 4, Schleicher et Schull n° 2040 a, Arches 301 et 304) nous ont conduits à adopter l'Arches 301, dont le grain est assez fin et qui nous a donné les meilleurs résultats.

La feuille d'électrophorèse, dont les dimensions sont de 27×28 cm, est divisée dans son tiers inférieur en trois parties dont les deux latérales, de 2 cm de largeur, trempent dans des cuves à électrolyte où plongent également les électrodes constituées par deux grosses mines de graphite. La partie médiane traverse une fente ménagée à cet effet dans l'appareil. Elle est découpée en douze dents d'où s'écoulent goutte à goutte les fractions séparées que l'on recueille dans autant de tubes à essai. Ceux-ci sont maintenus dans un bain d'eau glacée afin d'éviter toute dénaturation des protéines isolées.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES. — Durrum préconise un tampon au véronal sodique additionné de 10 à 20 p. 100 de glycérol, substance qui présente un double avantage : d'une part, elle abaisse la tension de vapeur de l'électrolyte, et de ce fait, réduit l'évaporation ; d'autre part, en augmentant sa viscosité, elle ralentit le flux du liquide et accroît le pouvoir anticonvecteur du papier.

Nous ne pouvons utiliser le véronal sodique en raison de sa toxicité, les fractions séparées devant être utilisées *in vivo*. Aussi adoptons-nous un tampon au borate de sodium de force ionique $\mu = 0,025$ et de conductibilité $\lambda = 1,626$ milliohms. Son pH est égal à 8,9 et il ne peut être question d'y ajouter du glycérol sans modifier notablement cette valeur. Sa composition est la suivante :

Borate de sodium	4,760 g
Acide acétique cristallisable	0,264 g
Eau distillée	Q. S. P. 1 000 cm ³

Le niveau de l'électrolyte est maintenu constant dans le réservoir supérieur et l'écoulement doit être réglé pour obtenir un étalement maximum en même temps qu'une quantité suffisante d'éluat. La régularité du flux de tampon est une condition essentielle pour une bonne séparation.

La tension appliquée aux électrodes est de 500 volts. L'ensemble des deux feuilles est traversé par un courant dont l'intensité, de 5,5-6 mA, ne varie pas pendant toute la durée de l'expérience.

Une languette de papier filtre de 3 à 4 mm de largeur amène le sérum, ou plus généralement le mélange de substances à séparer, à la partie supérieure de la feuille à 11 cm du bord cathodique. La quantité de sérum habituellement mise en œuvre

est de 4 cm³ pour deux feuilles disposées symétriquement. La séparation totale des protéines est lente et l'électrophorèse doit être poursuivie pendant trente-six à quarante-huit heures.

Afin d'améliorer la dispersion des fractions protéiques, il y a intérêt à augmenter le champ électrique dans le haut de la feuille où il est le plus faible. On y parvient en doublant celle-ci de chaque côté et, comme il est indiqué en hachuré sur la figure 2,

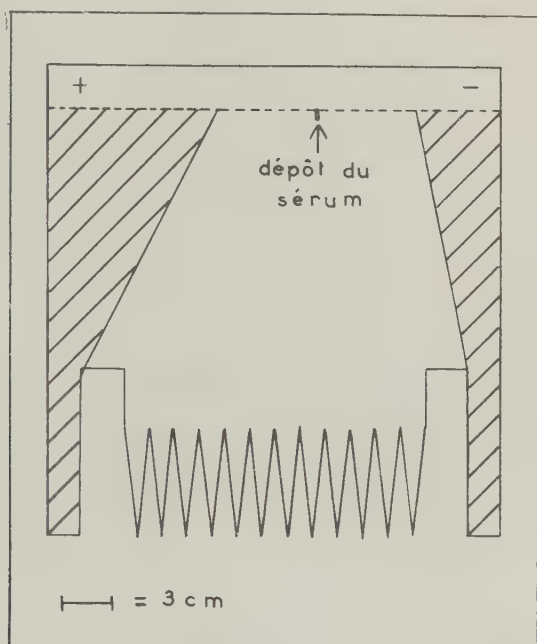


FIG. 2. — Schéma à l'échelle d'une feuille d'électrophorèse continue.

par une épaisseur de papier Arches 304 (plus épais que le 301) (fig. 2).

L'ensemble de ces conditions expérimentales nous permet un étalement maximum des fractions protéiques sur neuf à onze dents (fig. 3). On les recueille diluées dans du tampon dans les tubes à essais correspondants (1,5 à 2 cm³ de solution dans chaque tube).

IDENTIFICATION DES FRACTIONS. — Il s'agit alors d'identifier aussi exactement que possible la composition protéique des solutions contenues dans chacun de ces tubes.

Dans un premier temps, les feuilles sur lesquelles ont été effectuées les séparations sont révélées selon la technique que

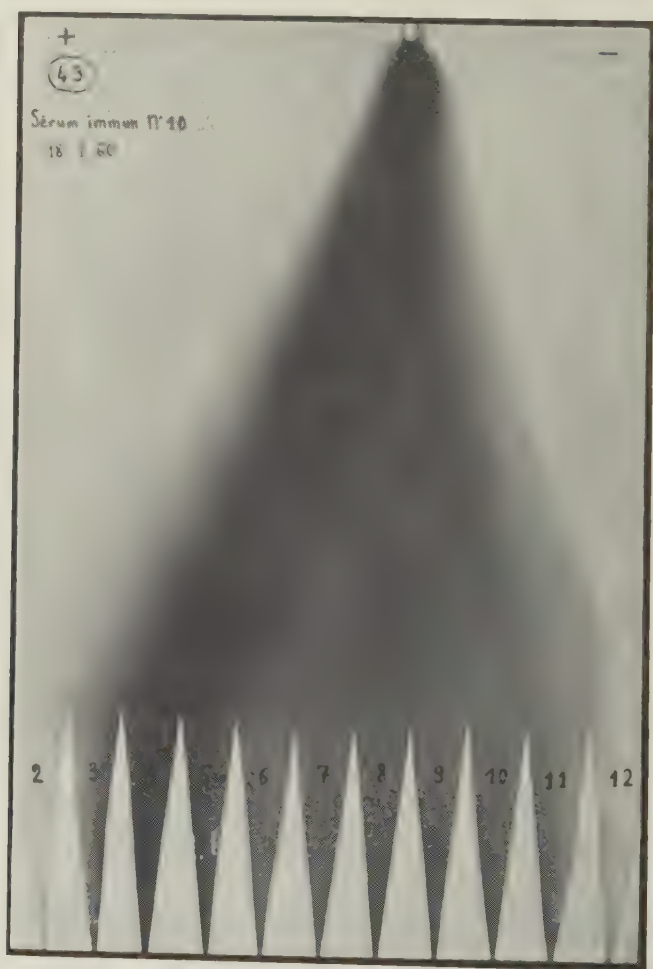


FIG. 3. — Photographie d'une séparation électrophorétique de sérum sanguin après coloration.

nous avons adoptée pour l'électrophorèse sur papier 4, 5), à savoir : fixées et colorées par une solution acétosilcockique de bleu de bromophénol, puis lavées à l'eau acétique, séchées et enfin bleuies à la vapeur d'ammoniaque.

On peut ainsi repérer le trajet des protéines et réunir dans un même flacon les fractions similaires des deux feuilles. Le contenu de chaque flacon est alors analysé par électrophorèse sur papier en tampon véronal sodique sous 150 volts pendant six heures trente [4]. Ces contrôles permettent également de vérifier qu'il n'y a pas eu dénaturation du sérum. Dans l'intervalle de chaque manipulation sérum et fractions séparées sont d'ailleurs conservés à -20°C .

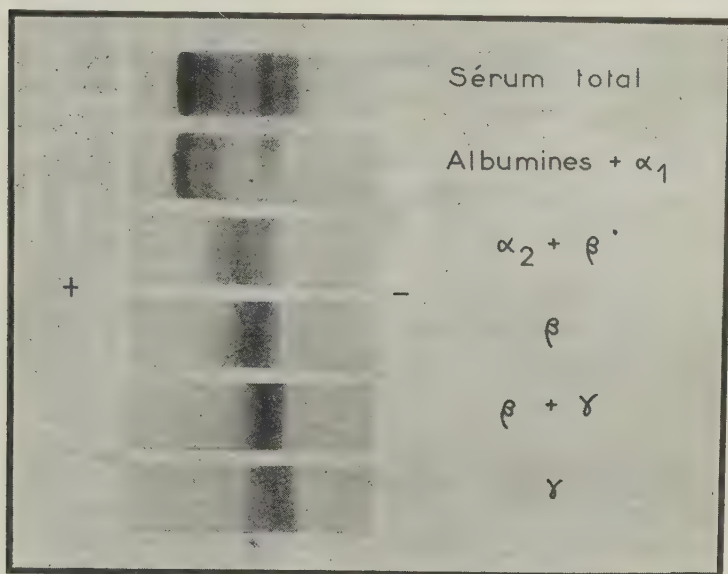


FIG. 4. — Photographie des électrophorèses des fractions séparées par la méthode du flux continu.

Nous donnons à titre indicatif la répartition que nous avons obtenue dans la plupart de nos séparations (fig. 4).

Dents 1-2-3	Albumines + α_1 -globulines
Dents 4-5	α_2 + β -globulines
Dents 6-7	β -globulines
Dents 8-9	β + γ -globulines
Dents 10-11	γ -globulines

RENDEMENT DE LA MÉTHODE. — Les quantités de sérum dont nous disposions n'étaient jamais très importantes. Il nous fallait donc connaître approximativement la fraction retenue par la feuille d'électrophorèse. Pour cela, nous avons effectué les deux contrôles suivants :

1° Nous avons soumis à l'électrophorèse continue 2 cm³ de sérum exactement mesurés, auxquels nous avons ajouté une trace de bleu de bromophénol. Ce colorant migre avec les albumines et nous permet de suivre la progression du front protéique. Notons qu'il faut environ sept heures à ce dernier pour atteindre les pointes. On révèle alors la feuille et on mesure avec le plus de précision possible la quantité de sérum restant.

2° Une deuxième expérience est conduite dans les mêmes conditions, mais lorsque les protéines atteignent le bas de la

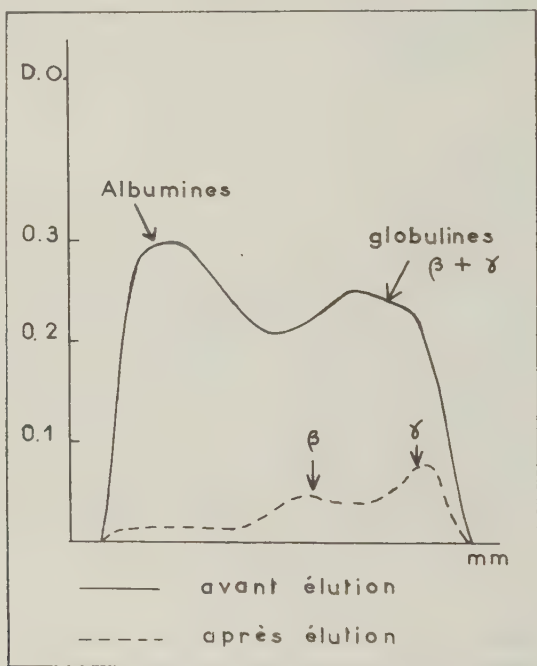


FIG. 5. — Adsorption des protéines par le papier filtre.

feuille, on arrête le passage du courant ainsi que l'arrivée du sérum, ne laissant subsister que le flux de tampon. Celui-ci entraîne par élution la plus grande partie des protéines. Seules restent sur le papier filtre celles qui s'y sont adsorbées et qu'on révèle au bout de quinze à dix-huit heures.

Il suffit alors de photométrer une bandelette découpée à la base de chacune de ces deux feuilles pour déterminer le pourcentage de protéines adsorbées. Les courbes obtenues montrent qu'elles sont surtout constituées de β - et γ -globulines (fig. 5).

Nous avons ainsi pu calculer que sur 2 cm³ de sérum mis en œuvre, le papier filtre en retient environ 0,5 cm³ dont le dixième y reste fixé par adsorption.

VALEUR DE LA MÉTHODE. — De nombreuses autres techniques de fractionnement des protéines sériques sont couramment utilisées, en particulier celles qui font appel à des réactions de précipitation par l'eau, l'éthanol ou les solutions salines. L'électrophorèse continue présente sur ces dernières, un certain nombre d'avantages.

1° C'est une *microméthode* qui, par les faibles quantités de sérum qu'elle nécessite, permet son application à de nombreux problèmes d'immunologie [6, 7].

2° Les fractions isolées ne subissent aucune dénaturation.

3° Elles peuvent être injectées à l'animal sans autre manipulation, ne présentant à cet égard que l'inconvénient d'être diluées dans la solution électrolytique.

Telle que nous l'avons utilisée, cette technique nous a permis une première séparation grossière, nous fournissant des fractions certes non homogènes, mais grâce auxquelles il nous a cependant été possible, en opérant par recouplement, d'obtenir un résultat satisfaisant et certain.

B. — CONCENTRATION DES DIFFÉRENTES FRACTIONS PROTÉIQUES.

Les différentes fractions recueillies après électrophorèse continue de 2 cm³ de sérum étant diluées dans la proportion de 5 sur 1, il n'est pas possible d'injecter ces grandes quantités de liquide à des rats. Pour réduire ce volume sans dénaturer les protéines, nous avons recours à la lyophilisation. L'appareil utilisé est le modèle MS 12 Usifroid. Les liquides sont congelés dans un mélange alcool-neige carbonique, la dessiccation sous vide s'opérant à — 75°.

Une expérience préliminaire nous a montré qu'une telle opération ne modifie pas la mobilité électrophorétique des protéines du sérum : les séries d'électrophorèses, obtenues avant et après lyophilisation du sérum total et des différentes fractions, sont rigoureusement superposables. Et une épreuve de séroprotection, réalisée selon la technique que nous indiquerons plus loin, a permis de vérifier que le pouvoir séro-protecteur était conservé.

Nous avons donc soumis à la lyophilisation toutes les fractions recueillies au cours des différentes séparations. Lors de l'emploi, la poudre obtenue est dissoute dans un volume d'eau distillée égal à 1/5 du volume initial. La lyophilisation et la dissolution sont faites dans le même tube de verre afin d'éviter

au maximum les pertes de produits. Il est même possible, en diminuant la quantité d'eau distillée, d'obtenir une concentration plus grande. Enfin, rappelons que, par suite de l'inégale intensité d'adsorption des protéines sur la feuille d'électrophorèse, notre coefficient de dilution est affecté d'une erreur dont il faudra tenir compte lors de la discussion.

C. — EPREUVE DE SÉRO-PROTECTION.

Le sérum de rat immum exerce un effet protecteur quand il est injecté dans la cavité péritonéale avant l'inoculation de globules rouges parasités. La parasitémie apparaît, mais reste très faible pendant trois, quatre ou même cinq jours. Le test est rendu plus sensible quand, par une saignée préalable, on a provoqué une forte réticulocytose sanguine, c'est-à-dire une augmentation du nombre des hématies susceptibles d'être parasitées ; l'accroissement très rapide de la parasitémie chez les témoins fait alors un contraste très net avec l'état stationnaire de l'infection sanguine chez les rats traités par l'immunsérum. Précisons cependant que la résistance naturelle présente parfois des variations assez grandes, des témoins étant relativement réfractaires au paludisme, ou bien un animal qui a reçu une injection d'immunsérum se révélant très réceptif à l'infection.

Selon notre technique habituelle [2], nous employons de jeunes rats pesant 50 g et saignés trois jours avant l'expérience. Ils reçoivent par voie péritonéale 1 cm³ d'immunsérum ou de solution de la fraction protéique étudiée ; les témoins reçoivent selon les cas, la même quantité de sérum normal, ou d'eau physiologique, ce qui ne provoque aucune différence d'évolution de la maladie par comparaison avec les animaux qui ne reçoivent aucune injection intrapéritonéale avant l'inoculation. Une heure après cette injection, tous les animaux sont inoculés par voie péritonéale avec une même quantité de globules rouges parasités (en général 25 millions). La parasitémie est ensuite étudiée deux fois par jour.

II. — RÉSULTATS.

L'expérience a été réalisée sur 35 rats : 6 ont reçu une injection d'immunsérum et 29 une injection de diverses fractions de ce même sérum. De plus, 6 témoins qui n'ont pas reçu de sérum ont servi de référence pour établir la courbe-type de la maladie.

Les résultats sont indiqués dans le tableau I. Les fractions β -globulines ou γ -globulines, isolées ou associées, ont produit un effet protecteur évident chez 12 rats sur 17. La protection est parfois égale à celle due à l'immunsérum, parfois plus faible, mais n'est jamais beaucoup plus importante. Les résultats aber-

TABLEAU I.

Fraction :	NOMBRE D'ANIMAUX	PROTECTION		
		forte	faible	nulle
γ	5	1	3	1
$\beta.\gamma$	2	1	—	1
β	8	4	1	3
$\beta. \alpha_1.\alpha_2$	2	—	2	—
Alb. $\alpha_1.\alpha_2$	12	—	—	12
Sérum immun	6	6	—	—

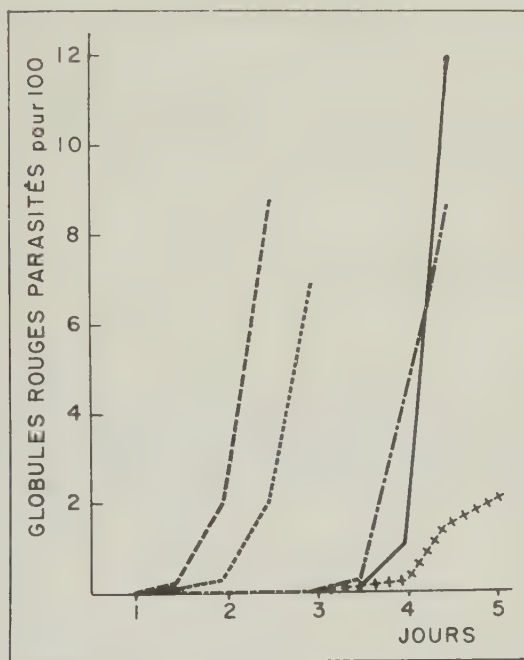


FIG. 6. — Action des différentes fractions protéiques. Fraction alb. α -globuline : — — — — —. β -globuline : + + + + +. γ -globuline : — . — . — . — . — . Sérum immun : —————, Témoins :

rants ne sont pas en proportion plus forte que ceux observés lors de toutes les épreuves de séro-protection.

Par contre, chez les 12 rats traités par les fractions albumines et α -globulines, aucune protection n'a été observée ; il semble

même qu'elles favorisent l'infection sanguine qui, dans tous les cas, s'est développée plus rapidement que chez les témoins. La figure 6 reproduit quelques courbes caractéristiques (fig. 6).

Le résultat de l'association des fractions protéiques devra être précisé ainsi que l'étude quantitative de ces faits, car comme nous l'avons indiqué plus haut, les pertes réalisées par l'adsorption de globulines sur le papier filtre sont relativement importantes.

CONCLUSION.

La technique du fractionnement des protéines par électrophorèse continue a été appliquée au sérum de rats immunisés contre *Plasmodium berghei* pour rechercher quelles sont les fractions protéiques susceptibles d'exercer un effet anti-plasmodial lors du test de séro-protection. Le pouvoir protecteur est lié aux fractions β -globulines et γ -globulines; les fractions albumine et α -globulines sont dépourvues de tout effet protecteur.

SUMMARY

ELECTROPHORETIC FRACTIONATION OF PROTEINS AND PROTECTING CAPACITY OF WHITE RATS SERUM AFTER IMMUNIZATION AGAINST *Plasmodium berghei*.

The technique of protein fractionation by continuous electrophoresis is applied to the study of rats serum after immunization against *Pl. berghei*, in order to demonstrate which protein fractions might have an anti-*Plasmodium* effect in the sero-protection test. The protecting capacity is bound to the β - and γ -globulins, the α -globulins and albumin being deprived of any protecting activity.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TALIAFERRO (W. H.). In BOYD. *Malariaology*, Saunders C°, Philadelphia, 1949.
- [2] FABIANI (G.) et FULCHIRON (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 99.
- [3] DURRUM (E. L.). *J. amer. chem. Soc.*, 1951, **73**, 10.
- [4] CHECHAN (C.) et VAILLS (C.). *Algérie méd.*, 1956, **60**, 5.
- [5] VAILLS (C.). *Thèse Pharmacie*, Alger, 1957.
- [6] AJL (S.), REEDAL (J.), DURRUM (E. L.) et WARREN (J.). *Fed. Proc.*, 1954, **13**, 485.
- [7] BRATTSTEN (I.), COLLEDAHL (H.) et LAURELL (A. H.). *Acta allerg.*, 1955, **8**, 339.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°)

Séance du 8 décembre 1960.

Présidence de M. Robert FASQUELLE

COMMUNICATIONS

INTERACTIONS MICROORGANISMES-MAÏS EN CULTURE HYDROPONIQUE AUX PREMIERS STADES DE CROISSANCE

par P. TARDIEUX, A. CHALVIGNAC, M. CHARPENTIER, J. LAJUDIE,
A. TARDIEUX et J. POCHON.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

La stimulation de la microflore du sol autour de l'appareil racinaire des végétaux est le résultat de mécanismes complexes dans lesquels la plante intervient directement et indirectement, mais qui sont aussi sous la dépendance de facteurs liés aux caractères du sol.

Il nous a paru que l'analyse de ces mécanismes serait facilitée si l'on étudiait l'effet rhizosphère dans des conditions simplifiées et facilement contrôlables. C'est ce que permet la culture sur milieu aqueux. Dans ce cas, en effet, les facteurs agissant sur une microflore tellurique de référence résultent uniquement, d'une part, du développement racinaire, d'autre part, de la présence des microorganismes apportés par la graine. Cette technique s'applique bien au maïs, dont la graine possède assez de réserves pour permettre un développement sur eau distillée pendant quelques semaines. Il est donc possible d'étudier les interactions entre la plantule et les microorganismes d'une rhizosphère artificielle connue, aux premiers stades de la croissance.

TECHNIQUE. — Le dispositif de culture hydroponique a été décrit précédemment [1]. On répartit une seule graine de maïs dans chaque tube stérile, et on laisse les racines se développer dans 15 ml d'eau distillée :

a) Soit en présence seulement des bactéries apportées par la graine elle-même, qui a été prélevée aseptiquement sur l'épi maïs non désinfectée.

b) Soit en présence seulement des bactéries telluriques apportées par 1 ml d'une suspension à 1 p. 1 000 d'une terre de référence, la graine ayant été désinfectée dans un bain d'hypochlorite de calcium.

c) Soit en présence simultanée de la microflore de la graine et de la microflore tellurique de référence.

Après quinze jours on réunit pour chacune des trois séries le contenu liquide d'au moins dix tubes, en prenant soin d'égoutter et de broser doucement les racines.

La composition de la microflore dans les trois échantillons moyens ainsi obtenus est comparée avec la microflore de la graine et celle de la terre de référence, analysées séparément et dans des conditions identiques, hormis le développement des racines de maïs.

L'analyse comporte :

1° Une appréciation de l'activité de la microflore totale et des groupes fonctionnels suivants : ammonifiants, protéolytiques, nitrificateurs, dénitrificateurs, amylolytiques.

2° Un examen de la répartition en groupes morphologiques.

3° Un examen de la répartition en groupes nutritionnels.

RÉSULTATS. — I. *Microflore totale et groupements bactériens physiologiques.* — L'activité a été appréciée par la méthode habituelle de numération en milieu liquide [2]. Les résultats sont présentés

TABLEAU I.

	FLORE TOTALE	FLORE THERMOPHILE	AMMONIFI- CATION	PROTÉOLYSE	DÉNITRIFI- CATION	AMYLO- LYSE	INDICE DE NITRIFICATION	
							NO ₃	NO ₂
Témoin 1. Microflore de la graine.	1,6.10 ⁶	5	0,75.10 ⁶	—	0	0	0	0
Effet rhizosphère sur la mi- croflore de la graine seule...	700.10 ⁶	5	22,5.10 ⁶	—	15	22	0	0
Témoin 2 Microflore de la terre.	16.10 ⁶	1 800	25.10 ⁶	3.10 ⁶	1.10 ⁶	12,5.10 ⁶	2	1,5
Effet rhizosphère sur la mi- croflore de la terre seule...	100.10 ⁶	1 300	9,5.10 ⁶	0,3.10 ⁶	2,2.10 ⁶	0,75.10 ⁶	2	2,5
Effet rhizosphère sur micro- flore de la graine + mi- croflore de la terre.	1 000.10 ⁶	1 300	25.10 ⁶	50.10 ⁶	7,5.10 ⁶	7,5.10 ⁶	1,5	2,25

dans le tableau I, exprimés en nombre de germes rapporté à une graine et à 1 milligramme de terre. Pour la nitrification, toutefois, l'indice utilisé exprime seulement la dilution moyenne jusqu'à laquelle on obtient production de nitrites et de nitrates.

II. — *Groupes morphologiques et types nutritionnels.* — La répartition en groupes morphologiques et nutritionnels a été étudiée en procédant pour chaque échantillon à l'isolement de 50 à 100 souches bactériennes sur milieu à l'extrait de terre gélosé, donc non sélectif. L'isolement était effectué en boîtes de Petri par étalement de 0,1 ml de suspensions-dilutions donnant, dans ces conditions, de 10 à 30 colonies par boîte après huit à quinze jours d'incubation à 28°.

Chaque souche isolée était soumise, d'une part à l'examen microscopique, d'autre part, à des repiquages en série pour apprécier son pouvoir de synthèse, sur les trois types de milieux suivants.

1° Milieu de base + nitrate de potasse.

2° Milieu de base + hydrolysate de caséine.

3° Milieu de base + extrait de levure + extrait de terre.

Le milieu de base était une solution saline additionnée de glucose.

TABLEAU II. — **Evolution de la microflore du point de vue morphologique.**

1° Microflore de la graine :

65 p. 100 de bacilles asporulés, Gram négatifs, mobiles ;

35 p. 100 de cocci, dont une moitié Gram positifs et une moitié Gram négatifs.

2° Effet rhizosphère sur la flore de la graine seule :

96 p. 100 de bacilles asporulés, Gram négatifs dont 9 sur 10 sont mobiles et 1 sur 2 pigmentés ;

2 p. 100 de bacilles asporulés, Gram positifs, mobiles ;

2 p. 100 de cocci Gram positifs.

3° Microflore de la terre :

91 p. 100 de bacilles asporulés soit :

58 p. 100 Gram positifs, dont 1 sur 2 est mobile et 1 sur 15 pigmenté.

33 p. 100 Gram négatifs, dont 1 sur 5 est mobile et 1 sur 2 pigmenté ;

1 p. 100 de bacilles sporulés, immobiles, apigmentés ;

8 p. 100 de cocci Gram positifs, apigmentés.

4° Effet rhizosphère sur la flore de la terre seule :

90 p. 100 de bacilles asporulés soit :

5 p. 100 Gram positifs, dont 1 sur 3 mobile et 1 sur 3 pigmenté ;

85 p. 100 Gram négatifs, dont 1 sur 4 mobile et 2 sur 3 pigmentés ;

3 p. 100 de bacilles sporulés, Gram positifs, mobiles, apigmentés ;

7 p. 100 de cocci Gram positifs, dont 3 sur 4 sont pigmentés.

5° Effet rhizosphère sur 2 flores (graine et terre) associées :

58 p. 100 de bacilles asporulés soit :

20 p. 100 Gram positifs, dont 1 sur 2 mobile et tous apigmentés ;

38 p. 100 Gram négatifs, dont 1 sur 3 mobile et 1 sur 2 pigmenté ;

11 p. 100 de bacilles sporulés, dont la moitié sont Gram positifs, immobiles, apigmentés et la moitié Gram négatifs, mobiles, pigmentés ;

31 p. 100 de cocci Gram positifs, dont 1 sur 10 est pigmenté.

Les résultats sont présentés dans les tableaux II et III et exprimés en pourcentage d'isolements de chaque groupe.

TABEAU III. — Evolution de la microflore du point de vue nutritionnel.

	N MINÉRAL	N AMINÉ EXIGÉ	FACTEURS DE CROISSANCE EXIGÉS
Microflore de la graine	90	10	0
Effet rhizosphère sur la microflore de la graine seule	80	20	0
Microflore de la terre témoin	81	9	10
Effet rhizosphère sur la microflore tellu- rique seule	57	31	11
Effet rhizosphère sur l'ensemble des mi- croflore.	11	14	75

DISCUSSION. — La terre de référence choisie était une terre de jardin assez riche et le dosage utilisé dans l'apport à chaque tube n'élimine pratiquement que les fixateurs libres aérobies. Mais on sait déjà par ailleurs que le filtrat de culture liquide de maïs est inhibiteur pour les *Azotobacter* [4].

On constate, dans les conditions utilisées ici, une stimulation beaucoup plus accentuée sur la microflore de la graine, lorsqu'elle est apportée seule, que sur la microflore de la terre. Les bactéries qui bénéficient le plus du développement des racines sont donc celles qui sont normalement portées par la graine. Mais leur stimulation retentit secondairement sur la microflore tellurique, comme le montre la comparaison des effets exercés sur celle-ci par la germination des graines désinfectées ou non désinfectées. On constate alors un effet rhizosphère nettement plus accusé lorsque les graines n'ont pas été débarrassées des bactéries qui les accompagnent habituellement. Cet effet s'applique même à des groupes physiologiques pratiquement absents de la microflore de la graine.

Au point de vue nutritionnel, cet effet secondaire se traduit par une stimulation préférentielle et importante des espèces telluriques à faible pouvoir de synthèse, qui passent de 10 p. 100 à 75 p. 100. Au contraire, la stimulation à partir de graines désinfectées porte préférentiellement sur les espèces croissant sur azote aminé et ne modifie pas le taux des espèces plus exigeantes.

Sachant, par ailleurs [3], que les racines de maïs se développant en condition hydroponique excrètent dans le milieu de nombreux amino-acides ou amides, on est amené à envisager schématiquement l'effet rhizosphère précoce du maïs comme résultant de deux facteurs eux-mêmes liés :

1° Excrétion radiculaire stimulant surtout les bactéries attachées à la graine.

2° Production par celles-ci de facteurs de croissance stimulant, dans la flore tellurique, les bactéries à faible pouvoir de synthèse.

RÉSUMÉ. — En obtenant en milieu aqueux la germination du maïs et les premiers stades de croissance de la plantule, on peut mettre en évidence une action quantitative et qualitative sur la microflore d'une terre de référence.

Cet effet a été étudié au point de vue de la répartition en groupes physiologiques, morphologiques, nutritionnels. Il semble résulter, d'abord, d'une stimulation par les excréctions radiculaires, à laquelle les bactéries habituellement liées à la graine sont les plus sensibles, puis d'un retentissement secondaire sur les bactéries du sol les plus exigeantes en facteurs de croissance.

SUMMARY

INTERACTIONS BETWEEN MICROORGANISMS AND MAIZE IN HYDROPONIC CULTURE, DURING THE FIRST STAGES OF THE GROWTH.

The germination and the first stages of the growth are carried out in a water medium. It is then possible to demonstrate a quantitative and qualitative activity on the microflora of a standard soil.

This effect is studied from the viewpoint of distribution into nutritional, morphological and physiological groups. This activity seems to be due first to a stimulation induced by the roots excretions to which the bacteria bound to the seed are the most sensitive, then to a secondary effect on soil bacteria possessing a low synthesis capacity.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] POCHON (J.) et BARJAC (H. DE). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 419.
- [2] POCHON (J.) et coll. *Manuel technique d'analyse microbiologique des sols*, Masson, édit., Paris, 1954.
- [3] KANDLER (O.). *Z. Naturforsch.*, 1951, **68**, 437.

A PROPOS DE L'AGGLUTINABILITÉ DES SOUCHES DE *LEPTOSPIRA AUSTRALIS*

par Marcel MAILLOUX et Berthe KOLOCHINE-ERBER.

(Institut Pasteur, Paris)

Depuis longtemps déjà, et notamment lors d'une étude sérologique sur la leptospirose à *L. australis* [8], nous avons été frappés par les différences de pouvoir agglutinant trouvées entre diverses souches d'un même sérotype.

Cette remarque vient après beaucoup d'autres qui ont été faites à propos du pouvoir antigénique de certains leptospires. D'après les

résultats des épreuves d'absorption des agglutinines, des biotypes à antigène complet AB et à antigène incomplet A ont été proposés pour certains sérotypes, en particulier pour *L. ictero-hemorrhagiae* souche Wijnberg AB et souche Kantorowicz A (Gispen et Schüffner [4, 10]). Pour *L. canicola*, une division en deux groupes a été aussi proposée, mais n'a guère été adoptée par les chercheurs. Certains auteurs rapprochent dans un même séro groupe des sérotypes très voisins, mais pour lesquels l'absorption croisée des agglutinines décèle une parenté.

Dans une étude sur *L. ballum*, Babudieri [2] compare des souches différentes d'après leur agglutination par les sérums. Plus récemment, Babudieri et Castelli [3], à propos de la valeur des souches autochtones de *L. ictero-hemorrhagiae*, notent que certaines souches (locales ou non) sont agglutinées à des titres plus élevés que d'autres. Pour les auteurs, il ne s'agirait pas de constitution antigénique différente d'après la saturation des agglutinines. Enfin, Alexander et ses collaborateurs [4] ont montré des différences entre des souches de *L. pomona*.

Dans sa classification des leptospires basée sur des recherches d'absorption des agglutinines, Kitaoka [5] émet l'hypothèse d'une mosaïque d'antigènes : chaque souche aurait un antigène principal de groupe et des antigènes secondaires, ce qui explique déjà certaines similitudes ou certaines différences. Pour *L. australis*, il y aurait un antigène principal, et des antigènes accessoires, non mis en évidence par les épreuves d'absorption mais par la réaction d'agglutination. Ils sont indiqués en chiffres de caractères différents ; d'autres chiffres, placés en indice, représentent l'activité de chaque antigène. La formule de *L. australis* est : VI 4₂ 5₂, mais l'auteur ne donne pas le nom de la souche qu'il a étudiée.

Un travail très récent de Kmety [6] rapporte une étude antigénique de souches de *L. australis*. Là encore est donnée une formule numérique qui représente la formule antigénique. L'auteur propose : 1, 2, 3, 4 pour la souche Ballico.

La connaissance de la constitution antigénique est de première importance en sérologie [13] ; elle intervient peut-être dans la virulence des souches, dans l'adaptation aux hôtes vecteurs, dans la distribution géographique et dans la répartition des épidémies.

Le travail actuel semble rapprocher ces faits de ceux qui ont été observés par Babudieri et Castelli.

Cette étude est uniquement centrée sur le sérotype *L. australis* pour lequel le plus grand nombre de données ont été recueillies.

Le tableau I donne les taux limites de sérums examinés vis-à-vis des trois souches de *L. australis* : souche Ballico, souche Mer. et souche Fas. La souche Ballico est la souche-type isolée par Lumley en 1937 au Queensland (Australie) [11, 12 13]. La souche Mer. et la souche Fas., indochinoises, ont été isolées en 1951 de malades de l'hôpital Grall à Saigon [7]. Les épreuves de saturation des agglutinines montrent que les trois souches Ballico, Mer., Fas. appartiennent au sérotype *L. australis* [7, 9].

Si l'on compare les taux d'agglutination de *L. australis* Ballico à ceux de la souche Mer., il peuvent être égaux (nos 7, 9, 11), ou supérieurs (nos 1, 2, 3, 4, 6, 10), ou inférieurs (nos 5, 8, 12, 13, 14, 15). Par rapport à la souche Fas., ils sont le plus souvent inférieurs (nos 4, 5, 7, 8,

TABLEAU I.

Sérums	SOUCHES DE <u>LEPTOSPIRA AUSTRALIS</u>		
	Ballico	Mer. Saïgon	Fas. Saïgon
n° 1 B.J.	100	0	50
n° 2 Ma	100	0	50
n° 3 Pa	100	50	50
n° 4 B.A.	10	0	500
n° 5 P.Ch	50	500	500
n° 6 R.G.	1.000	0	10
n° 7 A.M.	500	500	2.000
n° 8 Br	100	500	3.000
n° 9 B.Cl	500	500	5.000
n° 10 Chien M ^r A.	2.000	1.000	20.000
n° 11 Mi	8.000	8.000	100.000
n° 12 Pl	100	8.000	
n° 13 Le	0	20.000	
n° 14 Fr	0	20.000	
n° 15 Fo	10.000	200.000	

9, 10, 11), rarement supérieurs (n°s 1, 2, 3, 6). On pourrait être tenté de croire que les souches Mer., Fas. et surtout cette dernière présentent parfois plus d'affinités que d'autres pour certains sérums : c'est le cas le plus fréquent, mais le cas n° 6 est à retenir parce qu'il est le seul pour lequel la souche Ballico présente un avantage net sur Fas., puisque la réponse est négative pour la souche Mer. et faible pour la souche Fas.

Les différences peuvent être telles que l'une des souches n'est pas agglutinée, alors que l'autre l'est fortement : par exemple, Ballico pour les cas n°s 13 et 14, Mer. pour le cas n° 6 ; plus faiblement pour les cas n°s 1, 2 et 4.

Nous avons, alors, étudié (tableau II) l'agglutinabilité de ces souches par les divers sérums anti-*L. australis* préparés chez le lapin à partir des trois souches respectives. Il est à noter, sur ce tableau, que pour les sérums Ballico et Mer., les taux d'agglutination-lyse sont plus élevés pour la souche Fas. que pour les souches homologues. Le sérum Mer. a un taux plus élevé pour les deux souches hétérologues que pour la souche homologue. Enfin, la souche Fas. est agglutinée plus fortement que les autres. Ces réponses ne sont pas en relation avec les faits observés en présence des sérums des malades.

Ces réactions ont été refaites plusieurs fois, avec des sérums expéri-

TABLEAU II.

	SOUCHES DE <u>LEPTOSPIRA AUSTRALIS</u>		
Sérums agglutinants	Ballico	Mer. Saigon	Fas. Saigon
Sérum anti-Ballico	10.000 lyse 5.000	1.000 lyse 100	50.000 lyse 10.000
Sérum anti-Mer. Saigon	20.000 lyse 2.000	10.000 lyse 2.000	100.000 lyse 10.000
Sérum anti-Fas. Saigon	200.000 lyse 20.000	100.000 lyse 20.000	1.000.000 lyse 500.000

mentaux de trois lots de lapins différents, afin d'éliminer dans les réponses les différences dues à chaque animal.

S'agit-il ou non d'une différence de constitution antigénique ? Faut-il expliquer cette différence du pouvoir agglutinant par la présence de certains antigènes accessoires plus ou moins nombreux et rares ? Dans l'état actuel de la question, il est difficile de répondre. En tout cas, le fait a une grande importance dans l'étude épidémiologique des leptospiroses. Tous les cas de leptospiroses à *L. australis* qui ont été identifiés n'ont pas été approfondis dans ce sens, mais le peu qui est exposé ici montre l'importance de l'agglutinabilité des souches, quelle que soit leur nature, puisque même en présence de

plusieurs souches, la réponse peut être négative, douteuse ou positive, selon le choix. Ces remarques sont faites à propos de souches isolées à Saigon, toutes deux de même âge, mais plus jeunes que la souche Ballico. Comme Babudieri et Castelli [3] l'ont montré pour leurs souches de *L. ictero-hemorrhagiae*, certaines souches ont un pouvoir agglutinant spécial et d'autres sérotypes, de même origine, ont une valeur antigénique universelle. Des souches isolées à Dakar, à Tahiti, à Saigon (*L. ictero-hemorrhagiae*) agglutinent des sérums de malades dans les mêmes limites quelle que soit la « nationalité » des sujets.

Cette « valeur » différente des souches de leptospires d'un même sérotype reste pour le moment inexpliquée. Ni l'origine, ni l'ancienneté de la souche, pas plus que la provenance du sérum ne semblent, actuellement, jouer un rôle primordial. Mais ce phénomène nous a paru très important au point de vue du choix des souches pour les sérodiagnostics et au point de vue de la place et du rôle de chaque souche dans un sérotype.

RÉSUMÉ. — Après une revue succincte des travaux sur les divers taux d'anticorps anti-leptospires, le travail expose les titres bas ou élevés pour trois souches du sérotype *L. australis* : Ballico, Mer. Saigon, Fas. Saigon. Quinze exemples sont donnés et un tableau montre par des réactions croisées qu'il n'y a pas de parallélisme entre les souches homologues et les souches hétérologues. Aucune explication ne peut être donnée au sujet de la différence entre les souches d'un même sérotype ; mais le fait est d'un intérêt capital pour le choix des souches à utiliser dans les séro-diagnostic et pour l'épidémiologie.

SUMMARY

STUDIES ON THE AGGLUTINABILITY OF SOME STRAINS OF *Leptospira australis*.

After a rapid survey of the reports on differences in the antibodies of various serotypes of *Leptospira*, the authors describe the low and high titers of antibodies for three strains of the serotype *L. australis* : Ballico, Mer. Saigon and Fas. Saigon. Fifteen examples are given and a table shows by means of cross-reactions that there is no parallelism between homologous and heterologous strains. No explanation can be given for the differences between strains of a given serotype, but the fact is most important for the choice of strains to be employed for the serodiagnostic, and for the epidemiology.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALEXANDER (A. D.), EVANS (L. B.) et MARCHEWICKI (R.). *Amer. J. vet. Res.*, 1957, **18**, 708-712.
- [2] BABUDIERI (B.). *R. C. Ist. Sup. Sanità*, 1955, **18**, 57-64.
- [3] BABUDIERI (B.) et CASTELLI (M.). *R. C. Ist. sup. Sanità*, 1956, **19**, 50-58.
- [4] GISPEN (R.) et SCHUFFNER (W.). *Zbl. Bakt., Orig.*, 1939, **144**, 427.
- [5] KITAOKA (M. E.). *Jap. med. J.*, 1951, **4**, 181-214.
- [6] KMETY (E.). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 1960, **4**, 171-174.

- [7] KOLOCHINE-ERBER (B.), BRYGOO (E. R.), CROS (R.) et LAJUDIE (P. DE). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 608-634.
- [8] KOLOCHINE-ERBER (B.) et MAILLOUX (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 629-641.
- [9] LAJUDIE (P. DE) et BRYGOO (E. R.). *Méd. trop.*, 1953, 466-468.
- [10] SCHUFFNER (W.). *Genesk. Tijd.*, *Nederl. Indie*, 1939, **79**, 2470-2478.
- [11] WOLFF (J. W.). Le diagnostic des leptospiroses au laboratoire, in Zoonoses : Connaissances et techniques nouvelles, 1952. *Série de Monographies OMS/FAO*, n° 19, Genève, 1954, 145-158.
- [12] WOLFF (J. W.). Classification sérologique des souches-types de leptospires, in Zoonoses : Connaissances et techniques nouvelles, 1952. *Série de Monographies OMS/FOA*, n° 19, Genève, 1954, 159-170.
- [13] WOLFF (J. W.). *The laboratory diagnostic of leptospirosis*. Ch.-C. Thomas, édit., Springfield (U. S. A.), 1954.

CONTRIBUTION AU DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL D'*HEMOPHILUS INFLUENZAE* ET D'*HEMOPHILUS AEGYPTIUS*

par Jeanne ORFILA et Bernard COURDEN

(Chaire de Bactériologie et Institut du Trachome
de la Faculté de Médecine d'Alger)

L'autonomie d'*Hemophilus aegyptius*, ou bacille de Koch-Weeks, représente un problème toujours débattu. Isolé par Koch en 1883 et par Weeks en 1886 à partir de sécrétions conjonctivales, ce microbe, désigné successivement par les noms de *Bacillus aegyptius*, *Hemophilus conjunctivitis*, puis de *H. aegyptius*, n'a cependant pas été considéré par la majorité des bactériologistes comme étant réellement différent du bacille de Pfeiffer, ou *Hemophilus influenzae*. Et c'est seulement dans la dernière édition du Bergey's Manual en 1957 [1] que son individualité a été bien admise.

Les critères proposés pour établir cette distinction ont été, en effet, pendant longtemps très insuffisants, car il s'agit de différences portant sur la morphologie ou sur le pouvoir pathogène, le bacille de Weeks étant plus long et plus grêle et provoquant des conjunctivites à caractère épidémique, principalement dans les pays chauds. Mais peu à peu d'autres éléments de discrimination furent proposés : production d'indole et fermentation du xylose par le bacille de Pfeiffer [2], hémagglutination des globules rouges humains par le bacille de Weeks [3], différences morphologiques en microscopie électronique [4]. La distinction des deux espèces repose ainsi sur des bases plus larges et plus sûres. Et il est apparu possible de reconnaître l'un ou l'autre

de ces hémoglobinophiles dans des conditions pathologiques comparables ; c'est ainsi que Huet a pu affirmer la présence dans la flore de conjonctivites de bacilles de Pfeiffer aussi bien que de bacilles de Weeks [5].

Ayant eu l'occasion d'isoler 17 souches d'*Hemophilus* à partir de sécrétions conjonctivales, nous avons recherché de façon systématique la valeur des principaux éléments de diagnose déjà proposés. De plus, nous avons essayé d'étudier, non une maladie expérimentale caractéristique, mais la plus ou moins longue persistance dans le sang circulant des microbes injectés par voie intraveineuse chez la souris.

ETUDE DES CRITÈRES DÉJÀ PROPOSÉS. — 1° *Morphologie*. — Le bacille de Weeks est habituellement plus allongé que le bacille de Pfeiffer. La microscopie électronique révèle aussi la présence de formes sphéroïdes qui sont très rares chez *H. influenzae* ; mais il faudrait une recherche portant sur un plus grand nombre de souches pour savoir si cet élément de différenciation a une valeur absolue.

2° *Caractères des cultures*. — Sur milieu solide (Brain Heart Infusion Agar Difco, additionné d'extrait globulaire), les colonies d'*H. aegyptius* se développent moins rapidement et moins abondamment que celles d'*H. influenzae*. Pittman l'a déjà signalé.

3° *Hémagglutination des globules rouges humains*. — Cette épreuve positive avec *H. aegyptius*, est négative avec *H. influenzae*. Nous n'avons observé qu'une exception, que nous discuterons plus loin.

4° *Propriétés biochimiques*. — La production d'indole et la fermentation du xylose sont des caractères classiques de *H. influenzae*, mais ils nous sont apparus bien infidèles.

C'est donc sur le caractère des cultures et l'épreuve de l'hémagglutination que l'on peut établir une distinction sûre, car il y a régulièrement concordance entre les résultats de ces recherches. L'examen microscopique n'a qu'une valeur de présomption.

EPREUVE DE BACTÉRIÉMIE PROVOQUÉE. — *Technique*. — Nous employons les cultures de vingt-quatre heures sur milieu solide. La suspension obtenue par lavage de la surface de la gélose avec de l'eau physiologique stérile est agitée pour être parfaitement homogène ; par addition d'eau physiologique, sa densité optique est ajustée à 70 pour la longueur d'onde de 660 au spectrophotomètre de Bausch et Lomb. La numération des bactéries nous a montré que l'erreur faite en utilisant cette technique, de l'ordre de 10 p. 100, est négligeable. Après dilution à 1/10 de la suspension microbienne, nous injectons par voie intraveineuse, à des souris mâles de 25 g environ, 0,025 cm³ de cette suspension. A des temps précis (d'abord toutes les trois minutes, puis à des intervalles plus espacés), nous prélevons 0,025 cm³ de sang par voie rétro-orbitaire à l'aide de pipettes jaugées stériles. Le sang est immédiatement dilué dans 2,5 cm³ de milieu liquide (Brain Heart Infusion) lors du premier prélèvement, et dans 0,25 cm³ lors des prélèvements suivants. Des boîtes de Petri contenant le milieu solide à l'extrait globulaire sont alorsensemencées en surface avec 0,25 cm³

de chacune de ces dilutions. La numération des colonies d'*Hemophilus* est faite quarante-huit heures plus tard et permet de construire une courbe représentant l'évaluation de la bactériémie en fonction du temps (fig. 1).

RÉSULTATS. — Nous avons obtenu des courbes de deux types différents. Dans le premier type (6 souches), les courbes présentent une allure exponentielle : les microbes disparaissent très rapidement du sang. Dès la sixième minute, leur nombre est 10 fois moindre que celui trouvé lors du prélèvement trois minutes après l'injection ; à partir de la vingtième minute, le sang est devenu stérile et le restera indéfiniment. La souris, malgré les ponctions successives, retrouve rapidement un bon état général ; il n'y a pas de mortalité.

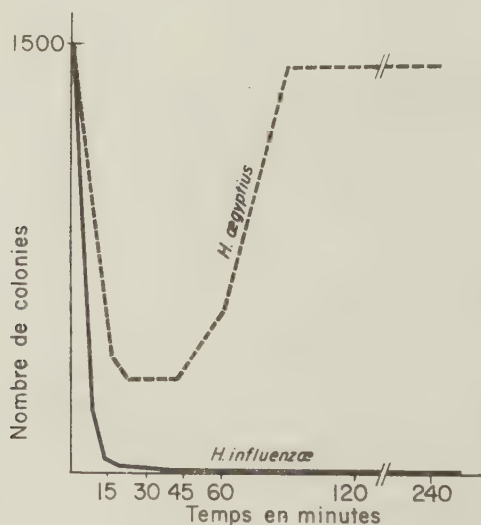


FIG. 1. — Epreuve de bactériémie provoquée.

Les courbes de type 2 (11 souches) ont une allure plus complexe mais sont également très comparables entre elles. Le nombre des microbes décroît très rapidement pendant les six ou neuf premières minutes, mais il n'y a pas disparition totale des germes du sang circulant ; la courbe dessine un plateau entre la vingtième et la quarantième minute, puis le nombre des microbes présents dans le sang augmente, pouvant atteindre rapidement et même dépasser la valeur de la bactériémie initiale. L'infection sanguine reste importante pendant les deux ou trois jours suivants, et la mort survient (dans 8 cas sur 11). Ces faits suggèrent l'existence de foyers viscéraux dans lesquels les microbes se multiplient. Cette hypothèse a été vérifiée

dans 4 cas : l'animal a été sacrifié, mourant, deux jours après l'injection. L'autopsie montra des foyers d'hépatisation pulmonaire et l'ensemencement des poumons révéla la présence de nombreux *Hemophilus*. Ces microbes étaient en moins grande abondance dans d'autres viscères (foie, rate, cerveau).

DISCUSSION DES RÉSULTATS. — Le tableau I rapporte l'ensemble des résultats. Nous voyons que, dans 16 cas sur 17, il y a concordance entre l'épreuve de l'hémagglutination et l'épreuve de bactériémie provoquée. Les microbes appartenant à l'espèce *H. aegyptius* disparaissent du sang de la souris de façon rapide et définitive. Par contre, les souches d'*H. influenzae* déterminent une infection sanguine persistante, entretenue par des foyers viscéraux, et provoquant la mort de l'animal.

Une seule souche (n° 10) fait exception : bien que l'épreuve de l'hémagglutination soit positive, la courbe de bactériémie est du type 2.

TABLEAU I.

SOUCHE NUMÉRO	MALADIE	HÉMAG- GLUTI- NATION	INDOLE	XYLOSE	ÉPREUVE DE BACTÉRIÉMIE PROVOQUÉE
—	—	—	—	—	—
1	Kératite.	+	—	+	Type 1.
2	Trachome surinfecté.	+	—	+	Type 1.
3	Conjonctivite.	+	—	+	Type 1.
4	Conjonctivite.	+	—	—	Type 1.
5	Conjonctivite.	+	—	+	Type 1.
6	Conjonctivite.	+	—	—	Type 1.
7	Conjonctivite.	—	—	+	Type 2.
8	Conjonctivite.	—	—	+	Type 2.
9	Ulcère cornéen.	—	+	+	Type 2.
10	Conjonctivite.	+	—	+	Type 2.
11	Conjonctivite.	—	—	—	Type 2.
12	Trachome surinfecté.	—	—	—	Type 2.
13	Conjonctivite.	—	—	—	Type 2.
14	Conjonctivite.	—	—	—	Type 2.
15	Conjonctivite.	—	—	—	Type 2.
16	Ulcère cornéen.	—	—	+	Type 2.
17	Trachome surinfecté.	—	—	—	Type 2.

L'explication de cette discordance est assez instructive : les souris utilisées pour cette dernière souche provenaient d'un élevage différent, et ces animaux étaient atteints d'une infection latente par une autre espèce d'*Hemophilus* dont les colonies ont les mêmes caractères que les souches d'origine humaine. La « sortie » de ces microbes était provoquée par l'injection intraveineuse des bactéries vivantes et même, comme nous l'avons recherché, des bactéries tuées par la chaleur. Cette infection latente était due à *H. influenzae murium*. Comme cette espèce n'exige pour sa croissance que le seul facteur X, nous avons pu la

distinguer facilement des autres souches étudiées, qui toutes exigeaient la présence simultanée des facteurs X et V.

La valeur pratique de cette nouvelle épreuve se trouve donc limitée par la possibilité de « sorties » microbiennes et aussi par sa difficile réalisation technique, qui exige le calibrage des pipettes, des ponctions répétées et de nombreuses manipulations. Cependant, cette épreuve de la bactériémie provoquée, confirme la distinction des deux espèces *H. influenzae* et *H. aegyptius* fondée sur la morphologie, les caractères biochimiques et l'hémagglutination.

Enfin, ces recherches prouvent avec certitude l'intervention du bacille de Pfeiffer en pathologie oculaire.

RÉSUMÉ. — L'étude de 17 souches d'*Hemophilus* isolées d'affections oculaires montre la valeur de la distinction établie entre les deux espèces *H. influenzae* et *H. aegyptius* fondée sur les caractères morphologiques, culturels et sur les résultats de l'hémagglutination. Une nouvelle épreuve, établissant la courbe des bactériémies après inoculation intraveineuse des microbes, confirme cette distinction.

SUMMARY

DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC BETWEEN *Hemophilus influenzae* AND *Hemophilus aegyptius*.

The study of 17 strains of *Hemophilus* isolated from ocular diseases demonstrates the existence of two species : *Hemophilus influenzae* and *Hemophilus aegyptius*, the differentiation being based upon morphological, cultural and hemagglutinating properties. A new test (bacteriemia curves after intravenous injection) confirms this differentiation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BREED (R. S.). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 7th édition, Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1957.
 - [2] PITTMAN (M.) et DAVIS (J.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 413.
 - [3] SMITH (C. M.). *J. Path. Bact.*, 1955, **68**, 284.
 - [4] LARMANDE (A.) et ORFILA (J.). Soc. fr. d'Ophtalmologie, séance de mai 1959. *Bull. Mém. Soc. fr. Ophtalm.* (sous presse).
 - [5] HUET (M.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1958, **35**, 78.
-

L'ASSIMILATION DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE PAR *NITROBACTER WINOGRADSKYI*

par V. A. KHOUDOKORMOFF (*)

(Laboratoire des Isotopes, Institut Pasteur, Paris,
et Laboratoire de Microbiologie du Sol, C. N. R. A. Versailles.)

L'étude du mode d'assimilation de l'anhydride carbonique par les bactéries chimio-autotrophes a fait l'objet, depuis quelques années, d'un certain nombre de travaux dont les résultats s'accordent avec l'existence, chez ces bactéries, d'un cycle analogue à celui décrit par Calvin dans la photosynthèse.

Dans le groupe des *Thiobacillus*, Santer et Vishniac [1] ont caractérisé la carboxydismutase dans un extrait de *Thiobacillus thioparus*, Trudinger [2] a mis en évidence dans des extraits de *Thiobacillus denitrificans* la plupart des enzymes participant au cycle de Calvin, Suzuki et Werkman ont également trouvé ces enzymes dans des extraits de *Thiobacillus thiooxydans* [3] ainsi qu'une carboxylase de l'acide phosphoénol-pyruvique [4].

L'existence du cycle de Calvin dans les bactéries en croissance a été prouvée par Aubert, Milhaud et Millet qui, travaillant avec *Thiobacillus denitrificans*, ont montré que le premier produit stable, décelable après incorporation de CO₂ radioactif, est l'acide 3-phosphoglycérique marqué dans le groupe carboxylique, que le mode de marquage du fructose-6-phosphate, du sédoheptulose-phosphate et du ribulose-diphosphate s'accorde avec le fonctionnement de l'aldolase, de la transcétolase et de la transaldolase, enfin qu'il existe une relation cyclique entre l'acide 3-phosphoglycérique et le ribulose-diphosphate [5, 6, 8]. Ces auteurs ont également montré l'existence d'une voie mineure d'incorporation du CO₂ par carboxylation du phosphoénol-pyruvate [7, 8].

Chez *Hydrogenomonas facilis*, Bergmann, Tower et Burris [9] et Mc Fadden [10], ont caractérisé dans les cellules entières quelques composés du cycle de Calvin.

Chez *Nitrobacter agilis*, Malavolta, Delwiche et Burge ont identifié, dans des cellules non proliférantes, l'acide 3-phosphoglycérique et des hexoses mono et diphosphates. Avec un extrait enzymatique, ils ont mis en évidence une estérification du phosphate minéral couplée à l'oxydation du nitrite [11]. Enfin, Engel [12] a montré avec *Nitrobacter winogradskyi*, que la fixation du CO₂ se faisait selon l'équation générale :



(*) Boursier de l'Institut National de la Recherche Agronomique. Adresse actuelle : Oostsingel, 173, Delft, Pays-Bas.

I. CONDITIONS D'ASSIMILATION DU CO_2 . — La souche de *Nitrobacter winogradskyi* Buch nous a été aimablement fournie par le professeur H. Engel de Hambourg. Les cultures sont faites sous aération intense à 30° dans le milieu suivant :

PO_4HK_2	0,5 g
SO_4Mg , 7 H_2O	0,15 g
SO_4Fe , 7 H_2O	0,03 g
NO_2Na	1 g
Eau déminéralisée	Q. S. P. 1 l
pH	7.1-7,2

Les bactéries en croissance sont centrifugées rapidement au froid puis remises en suspension dans du milieu neuf contenant 2 g/l de nitrite. La concentration finale est de 600 à 700 μg de bactéries (poids sec) par millilitre.

Au temps zéro on introduit 50 μC de CO_3Na_2 (2,5 μM) dans 15 ml de la suspension.

II. IDENTIFICATION DES COMPOSÉS FORMÉS. — Les composés de petits poids moléculaires formés après des temps courts d'exposition au $^{14}\text{CO}_2$ sont extraits par traitement des bactéries à l'alcool à 80 p. 100 et à 20 p. 100 bouillant pendant une minute. Les deux extraits sont réunis, concentrés, puis chromatographiés sur papier Whatman n° 4 dans le système de solvant suivant : phénol saturé d'eau, N-butanol-acide propionique-eau (2-1-1,4 en vol.). On procède ensuite à la radioautographie.

Les méthodes d'identification des composés formés sont essentiellement celles décrites par Benson et coll. [43].

Après cinq minutes d'incubation en présence de $^{14}\text{CO}_2$, nous avons identifié les composés suivants :

Composés phosphorylés : acide 3-phosphoglycérique, acide phospho-énolpyruvique, acide phosphoglycolique, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, sédoheptulose-7-phosphate, tréhalose-phosphate.

Acides et acides aminés : acides citrique et malique, acides glutamique et aspartique, alanine et glutamine.

Si on prolonge le temps d'incubation en présence de $^{14}\text{CO}_2$ on voit apparaître un composé non phosphorylé, qui après vingt minutes peut contenir jusqu'à 40 p. 100 de la radioactivité extractible à l'alcool aqueux. Ce composé a été identifié au tréhalose.

III. CINÉTIQUE DE L'INCORPORATION DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE. — Après une minute d'incubation en présence de $^{14}\text{CO}_2$, la radioactivité est répartie en majeure partie dans l'acide 3-phosphoglycérique, les hexoses-phosphates et le sédoheptulose-phosphate.

La variation en fonction du temps de la radioactivité relative contenue dans ces différents composés est représentée sur la figure 1.

L'allure des différentes courbes de la figure 1 s'accorde avec l'hypothèse de la formation initiale de l'acide 3-phosphoglycérique et de la formation ultérieure à partir de cet acide des oses phosphorylés.

CONCLUSION. — D'après tous ces résultats, il est très probable que *Nitrobacter winogradskyi*, comme les autres bactéries chimio-autotrophes déjà étudiées, assimile l'anhydride carbonique selon le cycle décrit par Calvin chez les organismes photosynthétiques.

La seule différence existant entre cette bactérie et les *Thiobacillus* ou les *Hydrogenomonas* réside dans la présence, chez *Nitrobacter*, de quantités relativement importantes de tréhalose-phosphate et surtout de tréhalose libre dont la signification physiologique reste pour l'instant encore obscure.

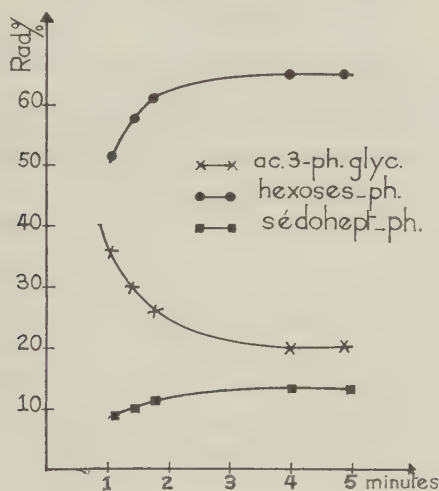


FIG. 1. — Pourcentage de la radioactivité incorporée dans différents composés par rapport à la radioactivité totale présente dans l'extrait.

RÉSUMÉ. — L'étude de l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ par les cellules en croissance de *Nitrobacter winogradskyi* nous a permis de caractériser la formation initiale de l'acide 3-phosphoglycérique, puis celle ultérieure des principaux composés du cycle de Calvin.

Ces résultats s'accordent avec l'hypothèse que cette bactérie possède le même cycle d'assimilation du CO_2 que les autres bactéries chimio-autotrophes déjà étudiées et que les organismes photosynthétiques.

SUMMARY

CO_2 ASSIMILATION BY *Nitrobacter winogradskyi*.

The study of $^{14}\text{CO}_2$ assimilation by growing cells of *Nitrobacter winogradskyi* shows that the first compound formed is the 3-phosphoglyceric acid, followed by the formation of the main constituents of Calvin's cycle, which have been identified.

These findings are in good agreement with the hypothesis according to which *Nitrobacter winogradskyi* possesses the same assimilation cycle as the other chimioautotroph bacteria already studied and the photo-synthetic organisms.

★
★★

Nous tenons à remercier M. H. Blachère qui nous a accueilli dans son laboratoire, et les D^{rs} J. P. Aubert et G. Milhaud qui nous ont fait profiter de leur expérience dans le domaine de l'utilisation des isotopes radioactifs.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SANTER (M.) et VISHNIAC (W.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **18**, 157.
 - [2] TRUDINGER (P. A.). *Biochem. J.*, 1956, **64**, 274.
 - [3] SUZUKI (I.) et WERKMAN (C. H.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **77**, 112.
 - [4] SUZUKI (I.) et WERKMAN (C. H.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, **76**, 103.
 - [5] AUBERT (J.-P.), MILHAUD (G.) et MILLET (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 2059.
 - [6] MILHAUD (G.), AUBERT (J.-P.) et MILLET (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **243**, 102.
 - [7] AUBERT (J.-P.), MILHAUD (G.) et MILLET (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 398.
 - [8] AUBERT (J.-P.), MILHAUD (G.) et MILLET (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 516.
 - [9] BERGMANN (F. H.), TOWNE (J. C.) et BURRIS (R. H.). *J. biol. Chem.*, 1958, **230**, 13.
 - [10] MCFADDEN (B. A.). *J. Bact.*, 1959, **77**, 339.
 - [11] MALAVOLTA (E.), DELWICHE (C. C.) et BURGE (W. D.). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1960, **2**, 445.
 - [12] ENGEL (H.) et MICHEL (P.). *Arch. Mikrob.*, 1959, **34**, 149.
 - [13] BENSON (A. A.), BASSHAM (J. A.), CALVIN (M.), GOODALE (T. C.), HAAS (V. A.) et STEPKA (W.). *J. Amer. chem. Soc.*, 1950, **72**, 171.
-

**PRÉSENCE DANS LE SÉRUM
DE LA TORTUE TESTUDO GRAECA EN BULGARIE
D'ANTICORPS AGGLUTINANT
PASTEURELLA TULARENSIS**

par P. PAVLOV, D. DIMOV, D. TCHILEV et J. JANEV

(Institut d'Hygiène de la Faculté de Zootechnie, Sofia ;
Station Nationale Epidémiologique, Sofia ;
Station de Recherches Vétérinaires et Station Sanitaire Epidémiologique,
Bourgas)

Quoique sa présence ait été reconnue dans les autres états balkaniques, la tularémie n'a pas encore été signalée en Bulgarie. C'est pourquoi nous avons procédé à des examens systématiques cherchant à mettre en évidence les agglutinines anti-*P. tularensis* dans les sérums de 64 hommes, de 442 mammifères divers (porcs sauvages, renards, chevreuils, lièvres, *Citellus*, rats sauvages) et de 210 tortues *Testudo graeca* capturées dans la région de Bourgas entre le 25 avril et le 1^{er} août 1959. Avec chaque échantillon, en même temps qu'à la recherche des agglutinines anti-*P. tularensis*, nous avons procédé à la réaction de Wright, ainsi qu'à la recherche des agglutinines anti-*C. burneti*.

Les sérums humains et ceux des autres mammifères n'ont donné que des résultats négatifs avec l'antigène *tularensis* (1). Par contre, 54 des sérums de tortues ont donné des agglutinations à des taux de dilution supérieurs à 1/100. Le tableau I indique, pour chaque sérum positif, le titre et la provenance.

Tous ces sérums n'agglutinaient pas *Brucella suis*. Les épreuves de saturation croisée ont montré que l'agglutination de *P. tularensis* n'était pas due à une brucellose.

Les 54 tortues qui avaient réagi positivement furent sacrifiées et autopsiées. Le foie de l'une d'elles (n° 143) contenait des foyers nécrotiques de la grosseur d'une tête d'épingle, à partir desquels les ensencements (sur milieu de Mac Coy et sur milieu Chapin) et les inoculations (8 cobayes et 22 souris blanches) furent négatifs. Le sérum de cette tortue agglutinait à 1/3 200 l'antigène *tularensis*.

(1) Souches provenant de l'Institut des Maladies tropicales de Gdansk (Pologne).

A l'examen des 53 autres, nous ne trouvâmes aucune lésion macroscopique, ni microscopique. Un broyat de tiques (*Hyalomma scupense* et *Dermacentor marginatus*) prélevées sur ces animaux fut injecté à deux cobayes avec un résultat négatif.

TABLEAU I. — Recherche chez *Testudo graeca* des anticorps agglutinant *P. tularensis*.

ORIGINE	NOMBRE DE TORTUES EXAMINÉES	NOMBRE DE SÉRUMS AGGLUTINANT. <i>B. tularensis</i>					
		TITRES					
—	—	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1 000	1/3 200
Vratiza	27	1	3	5	—	—	—
Krouchevez	15	—	—	2	2	1	—
Karanovo	6	—	—	1	—	—	—
Rossen	30	1	—	4	3	—	—
Trojanovo	23	—	2	3	1	1	—
Primorsko	8	—	—	1	—	—	—
Vesselié	55	2	4	3	4	1	2
Indgévojvoda...	5	—	—	1	1	1	—
M. Tirnovo	6	—	3	1	—	—	—
Novoselzi	3	—	—	—	—	—	—
Pomorié	5	—	—	—	—	—	—
Daskotna	3	—	—	—	—	—	—
Tarnak	2	—	—	—	—	—	—
Bata	3	—	—	—	—	—	—
Tchernomarez...	3	—	—	—	—	—	—
Dulevo	2	—	—	—	—	—	—
Fakia	3	—	—	—	—	—	—
Kozitchino	5	—	—	—	—	—	—
Rouptcha	2	—	—	—	—	—	—
Podvis	3	—	—	—	—	—	—
Nadir	1	—	—	—	—	—	—
Total	210	4	12	12	11	4	2

CONCLUSION. — Les sérums de tortues *Testudo graeca* capturées en Bulgarie, agglutinent *P. tularensis*; ceci dans la proportion de 26 p. 100 des individus et à des taux de dilution compris entre 1/100 et 1/3200. Cette fréquence et ces taux élevés contrastent avec l'absence d'agglutinines chez les êtres humains, chez les renards, chez les lièvres, etc.

Aucune souche de *P. tularensis* n'a encore été isolée en Bulgarie, même pas à partir des tortues à sérologie positive ni des tiques prélevées sur elles.

Nos recherches se poursuivent.

SUMMARY.

EXAMINATION IN BULGARIA OF *Testudo graeca* FOR THE PRESENCE OF ANTIBODIES AGGLUTINATING *Pasteurella tularensis*.

26 p. 100 of the sera of *Testudo graeca* captured in Bulgaria agglutinate *P. tularensis* at high titers (1/100 to 1/3 200). This frequency and high titers contrast with the absence of agglutinins in human beings, foxes, hares, etc.

No strains of *P. tularensis* has been thus far isolated in Bulgaria, even from tortoises yielding positive serological reactions and from their ticks.

Further studies are in progress.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etude de cinq souches de *Moraxella lwoffii* (*Acinetobacter lwoffii*) isolées de produits pathologiques, par E.-T. CETIN et K. TORECI.

Effets *in vitro* de certaines enzymes sur des fragments de cartilage provenant de l'oreille du lapin, par M^{lle} S. BAZIN et A. DELAUNAY.

Les réactions croisées dans la déviation du complément pour le diagnostic sérologique des affections à entérovirus avec les antigènes Coxsackie groupe B et ECHO, par L. ROBBA et M^{me} J. VIRAT.

Sur la nature de l'antigène O : 27 des *Salmonella*, par E. VAN OYE.

Etude des modalités d'action de quelques substances bactériostatiques à l'égard de *Staphylococcus aureus* par la méthode des courbes de croissance, par M^{lle} S. LAMBIN, A. GERMAN et J. BERNARD.

Sensibilisation expérimentale du porc à l'antigène de l'encéphalomyélite enzootique, par H. JACOTOT, J.-C. LEVADITI, A. VALLÉE et B. VIRAT.

La technique de séro-identification rapide des virus poliomyélitiques dans les selles. I. — Partie pratique, par G.-L. DAGUET, F. ROGER et M^{me} A. ROGER.

La technique de séro-identification rapide des virus poliomyélitiques dans les selles. II. — Partie théorique, par F. ROGER, M^{me} A. ROGER et G.-L. DAGUET.

Courbes d'agglutinines obtenues chez les lapins immunisés au moyen de différents vaccins anti-typhoïdiques, par A. BONNEFOI, S. LE MINOR et L. LE MINOR.

M. Errera et A. Forssberg. — *Mechanisms in Radiobiology*, vol. II, *Multi-cellular organisms*, 395 p., Academic Press, New York et Londres, 1960. Prix : \$ 13.

Le volume II a trait aux organismes multicellulaires et comprend des contributions fort intéressantes sur l'effet des radiations ionisantes sur la différenciation cellulaire, sur l'organisme adulte, sur l'immunologie, sur la protection et enfin sur la thérapeutique de l'organisme irradié.

Chaque chapitre est traité par un spécialiste de la question et comprend de très nombreuses références bibliographiques.

G. M.

Medical electronics. Proceedings of the second international Conference. 1 vol., 614 p., Paris, 24-27 juin 1959, Iliffe and Sons, édit., Londres, 1960. Prix : 145 shillings.

Ce volume reproduit les rapports et les communications présentés à la seconde Conférence internationale, consacrée à l'électronique médicale et tenue à Paris en 1959.

Les sujets traités sont répartis sous les têtes de chapitres suivantes : Techniques électrophysiologiques, Electroencéphalographie, Cardiologie, Manométrie et mesure des flux, Techniques acoustiques, Automation, Radiologie et Isotopes.

G. M.

Groupe d'étude de l'épidémiologie du cancer du poumon. Rapport. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, 1960, n° 192, 14 p. Prix : Fr. s. 1, --, 1/9, \$ 0,30. Publié également en anglais et en espagnol (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris).

Comité mixte FAO/OMS d'experts de l'hygiène du lait. Deuxième rapport. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, 1960, n° 197, 60 p. Prix : Fr. s. 2, --, 3/6 ou \$ 0,60. Publié également en anglais et en espagnol (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris).

Comité d'experts des maladies vénériennes et des tréponématoses. Cinquième rapport. Organisation mondiale de la Santé : Série de rapports techniques, 1960, n° 190, 82 p., Prix : Fr. s. 2, --, 3/6, \$ 0,60. Publié également en anglais et en espagnol (Dépositaire pour la France, Librairie Masson, Paris).